



# Pertinence et calibration d'un nouveau marqueur paléohydrologique : le rapport isotopique de l'hydrogène mesuré sur la miliacine

Nicolas Bossard

## ► To cite this version:

Nicolas Bossard. Pertinence et calibration d'un nouveau marqueur paléohydrologique : le rapport isotopique de l'hydrogène mesuré sur la miliacine. Sciences de la Terre. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2082 . tel-01296457

**HAL Id: tel-01296457**

**<https://theses.hal.science/tel-01296457>**

Submitted on 31 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE**  
**ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

**THÈSE** présentée par :  
**Nicolas BOSSARD**

soutenue le : **20 décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Terre et de l'Univers

**Pertinence et calibration d'un nouveau  
marqueur paléohydrologique :**

Le rapport isotopique de l'hydrogène mesuré sur la miliacine

**THÈSE dirigée par :**

**Elisabeth VERGES**

Directrice de Recherche, ISTO, Orléans

**co-encadrée par**

**Jérémy JACOB**

Chargé de Recherche, ISTO, Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Jaleh GHASHGHAIE**

Professeur, Université de Paris XI

**Christine HATTE**

Chargée de Recherche, CEA, Gif-sur-Yvette

---

**JURY:**

**Elisabeth VERGES**

Directrice de Recherche, ISTO, Orléans

**Jaleh GHASHGHAIE**

Professeur, Université de Paris XI

**Christine HATTE**

Chargée de Recherche, CEA, Gif-sur-Yvette

**Christian DIGIOVANNI**

Professeur, Université d'Orléans

**Fabien ARNAUD**

Chargé de Recherche, HDR, EDYTEM, Chambéry

**Valéry TERWILLIGER**

Professeur, Kansas University

**Jérémy JACOB**

Chargé de Recherche, ISTO Orléans







## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pu être menés à bien grâce au soutien financier du projet ANR PalHydroMil (ANR JCJC, 2011-2013). Je remercie le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (Action Thématique Prioritaire, 2009–2012) pour l'attribution d'une bourse de thèse.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au jury de cette thèse. A Mmes Jaleh Ghashghaie et Christine Hatté pour avoir accepté de rapporter ce travail et à Mme Valéry Terwilliger et Mrs Fabien Arnaud, Franck Brignolas et Christian Di Giovanni pour accepter d'évaluer ce travail.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse Elisabeth Vergès pour sa bienveillance et sa réactivité. Je garderai encore longtemps en mémoire ce voyage au lycée de Vierzon lors duquel je me suis rendu compte que finalement, l'accent perpignanais n'était pas si compliqué à comprendre.

Merci à toi Jérémy, toi qui est plus qu'un encadrant. Pour toutes ces discussions sur le sujet de thèse, la science en général, le monde de la recherche en particulier, la société, les délires, les prises de bec, le basket (ou pas), le hooters... Et tant d'autres choses qui, si elles étaient développées, doublerait facilement le volume de ce manuscrit. Merci.

A toi Claude, merci pour l'aide apportée que ce soit avec les appareils ou les questions scientifiques, le café toujours prêt à être servi et l'oreille à écouter. Merci.

A vous, Jean-Robert, merci pour toutes ces discussions lors des repas du midi. Vous le gourou de ces dames, il faudra encore m'apprendre deux trois trucs.

A vous les gens de BioEMCO, Thierry, Philippe et Patricia, pour m'avoir fait vivre une belle semaine dans votre labo et pour l'aide apportée au cours des manips et tout au long de la phase de calibration. Dites, j'aurais besoin des valeurs  $\delta D$  de l'eau des épis... Mais normalement vous devriez trouver ces valeurs ...

Valéry, merci pour toutes ces discussions abracadabrantesques sur les isotopes. Un jour je maîtriserai la biblio comme toi.

A toi Rachel, pour avoir partagé ton bureau pendant ces quatre ans, comment as-tu pu me supporter ? Bon, c'est vrai que je suis moins énervant que Rocky tout de même... Non ?

Je ne sais toujours pas si je dois vous remercier, vous qui pendant mon cursus m'avez donné goût à la recherche. Vous m'avez fait suivre un chemin très bizarre, pleins de bons moments, et d'autres un peu moins. Néanmoins, cette thèse est l'aboutissement de mon cursus de recherche, c'est pourquoi je tiens à vous remercier. Vous : Jean-Paul Robin, pour les criées du dimanche soir pendant ma licence. Vous : Noussithé Kouéta pour m'avoir appris à mener mes expériences par moi-même, à me poser les questions pour réussir un design expérimental, m'avoir

permis d'aller à la plage toutes les vacances de licence et master où les touristes me regardaient bizarrement, merci. Je me dois aussi de vous remercier, vous, Roselyne Buscail et Philippe Kerhervé pour avoir réussi à m'encadrer dans mes premiers rapports de chercheur avec la géologie.

La partie qui arrive va se compliquer, car je vais sûrement oublier des gens, veuillez m'en excuser d'avance, je pense quand même à vous (ou pas :p ). Alors merci à vous ceux que j'oublie dans la suite de mes remerciements. Ensuite, merci aux différentes générations de thésards qui ont fini avant moi, ainsi que celles qui finiront après moi. Fred, une petite pause café ? Myriam, Renata et Anaëlle, une pause croco ? Sylvain, je serai resté numéro 1 :p , Nour à quand un nouveau petit plat bien trop épicé pour un pauvre normand ? Une pensée aussi aux stagiaires qui ont dû s'habituer à ma façon de travailler : Johann, Manon, Joana.

Une pensée pour les collègues croisés dans les couloirs, pauses, journées Portes Ouvertes ou Salon de l'Etudiant ou que j'ai pu embêter pour un ordre de mission ou une réservation de salle au dernier moment. Martine, Cathy, Stéphane, Fabienne, Chantal, Olivier, ...

Parce que la géologie est loin de suffire pour s'épanouir, je souhaite maintenant remercier pour leur soutien et pour les bons moments passés ensemble, le monde associatif. Ces activités chronophages qui ont quelques fois pris le pas sur la thèse, il faut bien le reconnaître. Je tiens à remercier tous les doctorants membres à un moment ou à un autre de l'ADSO et qui ont eu le privilège d'entendre mes superbes blagues lors de soirées : Antonine, J.-H., Matthieu, Mathieu, Julien, Julie, Geoffrey, Maxime... mais une pensée aussi à ceux de l'ADOCT : Vince, Marmotte, Rhumaric, Jean-Louis, les premiers à m'avoir embarqué dans les virées tourangelles.

Enfin, je ne peux pas clore cette partie sans un petit pincement pour ce qui m'a réellement permis de me changer les idées. Les Petits Débrouillards. En particulier à toi Laurent, qui m'a fait découvrir cet univers, et avec qui j'adore discuter science et citoyenneté. Aux Petits Déb Orléanais : Kévin, Rachid, Eglantine... Et à toi aussi Louise, en espérant que le fait que je termine ma thèse te permettra d'achever ta formation et que tu m'écouteras quand je te dirai qu'Orléans n'est pas fait pour toi... ;) Et à mes co-membres du CA pour mon indisponibilité de ces derniers jours, mais promis, c'est fini et je vais être tout à vous.

Et enfin une pensée particulière pour ma famille, surtout pour ceux partis trop vite pour voir l'achèvement de cette thèse...

A tous... **Merci.**







# TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	11
TABLE DES TABLEAUX .....	15
CHAPITRE I – INTRODUCTION .....	17
A. Contexte général .....	17
1. Changement climatique actuel et questions posées sur le futur .....	17
2. Changement climatique et changement hydrologique .....	19
3. Quelques exemples d'interactions passées entre climat et sociétés .....	22
B. Comment reconstruire les changements climatiques/hydrologiques passés et établir leurs relations avec l'évolution des sociétés humaines .....	27
1. Les archives des changements environnementaux .....	29
2. Les traceurs préservés dans les archives .....	30
3. Le $\delta D$ moléculaire .....	39
4. Le projet PalHydroMil .....	48
CHAPITRE II – METHODES .....	57
A. Fractionnement isotopique possible lors des différentes étapes de la vie de l'échantillon .....	57
1. Prélèvements .....	57
2. Fractionnements associés à l'extraction des lipides .....	57
3. Fractionnements associés à la purification / séparation des lipides .....	58
B. Détermination des rapports isotopiques sur molécules individuelles .....	61
1. Fidélité, justesse et exactitude .....	61
2. Description de la GC-irMS .....	61
3. Vérifications des conditions d'analyse .....	64
4. Standards .....	65
5. Echantillons .....	68
6. Séquence .....	69
7. Méthodes analytiques .....	70
C. Chambres climatiques .....	71
CHAPITRE III - PERTINENCE .....	73
A. Spécificité de la miliacine comme traceur de <i>Panicum miliaceum</i> .....	75
1. Résumé en français .....	75
2. Abstract .....	75
3. Introduction .....	76
4. Materials and methods .....	78
5. Results and discussion .....	82
6. Conclusion .....	90
7. Acknowledgments .....	90
B. Compléments .....	91
1. Biotransformation de triterpènes par <i>C. olivaceum</i> .....	91
2. Culture de <i>C. olivaceum</i> sur des graines de millet .....	92
C. Pertinence spatiale du $\delta D$ de la miliacine dans <i>Panicum miliaceum</i> .....	95
1. Résumé en français .....	95
2. Abstract .....	95
3. Introduction .....	96
4. Site, materials and methods .....	Erreur ! Signet non défini.
5. Results .....	101
6. Discussion .....	105
7. Conclusion .....	110
8. Acknowledgments .....	110
D. Variabilité temporelle du $\delta D$ miliacine de 2008 à 2012 .....	112

E. Eau source dans le champ de Mézières-lez-Cléry .....	116
F. Transfert du $\delta D$ miliacine de la plante au sol .....	121
<b>CHAPITRE IV - CALIBRATION .....</b>	<b>128</b>
A. Fractionnement biosynthétique de deux variétés de <i>P. miliaceum</i> – Conditions contrôlées. 128	
B. Fractionnement biosynthétique d'une variété actuelle et d'une variété rudérale de <i>P. miliaceum</i> - Conditions naturelles.....	130
C. Fractionnement des isotopes de l'hydrogène pendant la synthèse de lipides par <i>Panicum miliaceum</i> . Expériences en chambre climatique. ....	132
1. Résumé en français .....	133
2. Abstract .....	133
3. Introduction.....	135
4. Material and Methods .....	137
5. Results.....	139
6. Discussion .....	144
7. Conclusion .....	152
8. Acknowledgments.....	152
D. Effet d'un gradient de PEG sur le fractionnement des isotopes de l'hydrogène pendant la synthèse de lipides par <i>Panicum miliaceum</i> . Expériences en chambre climatique. ....	154
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>160</b>
A. Pertinence du proxy $\delta D$ miliacine.....	160
1. Spécificité de la miliacine .....	160
2. Variabilité temporelle .....	160
3. Variabilité spatiale .....	160
4. Transfert du signal .....	160
B. Facteurs impactant le $\delta D$ moléculaire et quantification.....	161
1. Fractionnement biosynthétique de diverses variétés de millet.....	161
2. $\delta D$ de l'eau source.....	161
3. Stress hydrique à la racine (PEG) .....	162
4. Stress hydrique à la feuille (Humidité relative / température).....	162
C. Avantages et inconvénients du $\delta D$ moléculaire sur composés spécifiques pour reconstituer les variations du cycle hydrologique.....	162
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>164</b>
A. Hypothèses à confirmer ou à infirmer.....	164
B. Pistes de recherche au-delà des études "paléo".....	164
<b>REFERENCES.....</b>	<b>166</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Evolution des anomalies de température depuis l'an 1000 comparées à la moyenne de 1961-1990 dans l'hémisphère nord, Figure 2.21 de l'IPCC report 2007.....	17
Figure 2 : Evolution de l'humidité relative de 1998 à 2008 dans le monde. a) Tendance de l'humidité moyenne au sol ; b) Tendance de l'évapotranspiration ; c) Evolution des anomalies de l'évapotranspiration globale de 1998 à 2008 (d'après Jung et al., 2010).....	18
Figure 3 : A. Vue d'artiste de la glaciation totale du globe terrestre. (Crédit : Université de Bristol) B. Climat et bilan radiatif aujourd'hui et lors de la terre boule de neige, rôle de l'eau (tiré de Le Hir et al., 2007). ....	20
Figure 4 : Evolution temporelle de la composition isotopique ( $\delta^{18}\text{O}$ ) de la glace du Groenland (Johnsen et al., 1997). ....	21
Figure 5 : Les deux phases de la NAO, leurs conséquences sur le trajet des vents d'ouest, et sur la distribution des précipitations en Europe. Source : Lamont Doherty Earth Lab. ....	22
Figure 6 : Evolution des dynasties chinoises au regard du $\delta^{18}\text{O}$ d'une stalagmite prélevée dans la grotte de Wanxiang qui reflète l'intensité de la mousson asiatique d'été (d'après Zhang et al., 2008). ....	24
Figure 7 : Evolution des dynasties chinoises au cours des 1000 dernières années. a) Température reconstituée à partir du $\delta^{18}\text{O}$ de la figure 6 ; b) Nombre de guerres documentées ; c) Taille de la population. ....	25
Figure 8 : Types d'interactions possibles entre Climat, Société et Environnement. ....	27
Figure 9 : Exemples d'archives qui permettent de retracer l'évolution des paléoenvironnements en domaine continental. ....	29
Figure 10 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ des précipitations en fonction de la température moyenne au sol (Dansgaard, 1964). ....	34
Figure 11 : Notation du rapport isotopique de l'hydrogène d'un échantillon (ech : échantillon, std : standard). ....	36
Figure 12 : Rapports isotopiques des différents atomes de l'eau du standard V-SMOW, ppm = partie par million, les rapports sont tellement faibles que les valeurs sont multipliées par $10^6$ . ....	36
Figure 13 : Enregistrement du $\delta\text{D}$ météorique dans la matière organique sédimentaire (Modifié d'après Gleixner et Mugler, 2007). ....	37
Figure 14 : Réaction de photosynthèse.....	38
Figure 15 : Etat des connaissances liées à l'utilisation du $\delta\text{D}$ moléculaire dans les reconstitutions paléoclimatiques (D'après Sachse et al., 2012). ....	40
Figure 16 : Fractionnement isotopique de l'hydrogène de l'eau source.....	41
Figure 17 : Fractionnement isotopique de l'hydrogène de l'eau de la plante.....	43
Figure 18 : Différentes voies biosynthétiques de composés couramment utilisés comme biomarqueurs moléculaires - Modifié d'après Roberts, 2007. A gauche : MVA, mévalonate ; HMGR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase. A droite : MEP, méthylérythritol phosphate; DXS, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase; HDS, hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butényl 4-diphosphate synthase; IDS, isopentényl diphosphate:diméthylallyl diphosphate synthase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase. Les flèches en pointillés signifient qu'il y a plus d'une étape.....	44
Figure 19 : Archivage d'une molécule au cours du temps et dilution du signal précédent par le signal de l'année suivante. ....	47

Figure 20 : A : Localisation du Lac du Bourget, des principaux sites archéologiques qui ont été identifiés sur ses rives, du trajet des flux détritiques provenant du Rhône en période de crue et des sites de carottage sédimentaire (LDB01 et LDB04 ; extrait de Jacob et al., 2008a). B : Evolution du paramètre L* (indicateur de détritisme) dans la carotte LDB04 durant l'Holocène et relations avec d'autres enregistrements paléohydrologiques acquis dans les Alpes et le Jura (Debret et al., 2010).	49
Figure 21 : Evolution des concentrations en miliacine dans les sédiments du lac du Bourget (Extrait de Jacob et al., 2008).	51
Figure 22 : Structure de la miliacine (oléan-18-en-3 $\beta$ -ol méthyle éther).	51
Figure 23 : Evolution des concentrations en miliacine durant l'âge du Bronze dans les carottes LDB01 et LDB04 et correspondance avec la densité de dates mesurées sur des pieux archéologiques et l'évolution des niveaux lacustres (Jacob, non publié).	53
Figure 24 : $\delta$ D miliacine de graines de millet d'un même lot extrait à l'ASE et manuellement.	58
Figure 25 : Quantité de miliacine éluée en fonction de la quantité de solvant ajouté.	60
Figure 26 : Définition des paramètres Fidélité, Justesse et Exactitude.	61
Figure 27 : Photographie d'une GC-irMS (source ThermoFisher).	62
Figure 28 : Schéma simplifié d'un type de GC-irMS (adapté de Meier-Augenstein, 2004).	63
Figure 29 : Vue d'ensemble des constituants de la source (source : ThermoFisher).	63
Figure 30 : Photos lors du démontage de la source (source : Blog PalHydroMil). A : Source avant démontage. B : Vue extérieure de la partie inférieure de la source. C : Vue de l'intérieur de la source avant nettoyage avec les pièces dirigeant le faisceau d'atomes. D : Pièces nécessitant un nettoyage.	64
Figure 31 : $\delta$ D n-C16 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C16 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).	66
Figure 32 : $\delta$ D n-C17 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C17 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).	66
Figure 33 : $\delta$ D n-C25 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C25 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).	67
Figure 34 : $\delta$ D n-C28 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C28 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).	67
Figure 35 : $\delta$ D miliacine (calibrée en fonction des n-alcanes de Schimmelmann) (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de miliacine injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).	68
Figure 36 : Chromatogramme typique de la mesure $\delta$ D de la miliacine. Les points bleus représentent les 2 n-alcanes sur lesquels la calibration des mesures a lieu. 12 autres n-alcanes sont utilisés pour le suivi temporel des conditions d'analyse.	69
Figure 37 : Chambre climatique Rubic1 avec ses capteurs et les mesures données à un moment de la culture.	71
Figure 38 : Température de l'air consignée et mesurée dans Rubic 1 au cours de la culture.	72
Figure 39 : Structure of compounds discussed in the text.	77
Figure 40 : Distribution of pentacyclic triterpenes and other compounds on the partial chromatograms of the (a) ethe/ester and ketone, and (b) alcohol fractions of lipids extracted from seeds of <i>Panicum miliaceum</i> var. <i>sunrise</i> collected from the field at Mézières-lez-Cléry (France). 1, $\beta$ -amyirin ME; 2, miliacin; 3, $\alpha$ -amyirin ME; 4, friedelin; 5, cholesterol; 6, ergosterol; 7, stigmastadienol; 8, $\beta$ -amyirin; 9, germanicol; 10, glutinol; 11, $\alpha$ -amyirin; n-C <sub>x</sub> , alcohols.	82
Figure 41 : Standards injectés dans le milieu de culture de <i>Chaetomium olivaceum</i> .	91

Figure 42 : Développement d'un champignon sur un milieu de culture constitué de graines de millet.....	92
Figure 43 : Observations au microscope optique de <i>Chaetomium</i> à gauche et du champignon s'étant développé sur les graines de millet à droite.....	93
Figure 44 : Structure of miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether).....	97
Figure 45 : Location of <i>P. miliaceum</i> field, heterogeneity of soil properties on aerial picture (grey scale) and location of samples.....	99
Figure 46 : Chromatogram obtained by GC-irMS illustrating the distribution of miliacin and of a series of <i>n</i> -alkane standards ( <i>n</i> C <sub>16</sub> - <i>n</i> C <sub>30</sub> ) with $\delta$ D values measured offline (acquired from Arndt Schimmelmann, Indiana University, Bloomington, USA) used for normalising miliacin $\delta$ D values. * indicates the 5 $\alpha$ -cholestane, used as quantitation standard. ....	100
Figure 47 : a- Distribution of $\delta$ D values of miliacin extracted from the seeds of 61 plants collected in the Mézières-lez-Cléry field sorted by increasing plant height, which was considered pertinent due to the visual correlation between plant height and soil properties in the field. Maximum and minimum miliacin $\delta$ D values and the corresponding range (-98‰ to -144‰ V-SMOW; range of ~50‰ V-SMOW) are reported.; b- Frequency histogram of miliacin $\delta$ D values of all plants with calculated mean ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ); c- $\delta$ D values and standard deviation of miliacin $\delta$ D values averaged per stand, sorted by increasing plant height. Maximum and minimum of averaged miliacin $\delta$ D values (from -105 to -135‰ V-SMOW; range of 30‰) are reported; d- Frequency histogram of miliacin $\delta$ D values averaged per stand with calculated mean ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ). ....	102
Figure 48 : A. Vue générale du champ de Mézières. B. Vue d'un carottage de sol du champ de Mézières.....	116
Figure 49 : Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du sol avec la profondeur. ....	117
Figure 50 : Répartition spatiale des échantillons de sols prélevés dans le champ de Mézières-lez-Cléry. ....	122
Figure 51 : Histogrammes de fréquence du $\delta$ D miliacine depuis la plante jusqu'au sol (toutes les valeurs $\delta$ D sont exprimées en‰ V-SMOW).....	123
Figure 52 : Sites d'échantillonnage des deux variétés de millet <i>Panicum miliaceum</i> en Chine (image google map). ....	130
Figure 53 : Structure of miliacin. ....	136
Figure 54 : Experimental design. $\delta$ D and $\delta^{18}\text{O}$ values of the hydroponic solution are those measured and reported in Section 3.2.1. ....	137
Figure 55 : Water $\delta$ D values in different organs along an increasing hydroponic solution $\delta$ D. $\delta$ Dwo: $\delta$ D value of organs water. $\delta$ DHS: $\delta$ D value of Hydroponic Solution. NTO: Non Transpirative Organs (roots, collets, internodes, nodes). TO: Transpirative Organs (leaves). P: Panicle.....	140
Figure 56 : $\delta$ D values of non-transpirative organs (NTO), transpirative organs (TO and panicles – P), of miliacin and <i>n</i> -alkanes versus $\delta$ D values of the hydroponic solution in Rubic 5. ....	146
Figure 57 : Relations entre concentration en PEG et pression osmotique.....	155
Figure 58 : Evolution du $\delta$ D miliacine (en‰ V-SMOW) en fonction de la pression osmotique exprimée en bar. ....	156





# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Relations entre phases climatiques, guerres et changements de dynastie (Zhang et al., 2006).....	25
Tableau 2 : Méthode de séparation de la fraction des neutres totaux. ....	59
Tableau 3 : $\delta D$ de chacun des $n$ -alcane du standard fournis par A. Schimmelmänn. ....	65
Tableau 4 : Séquence type d'analyse en GC-irMS. Std : Standard de 15 $n$ -alcane ; Ech : échantillon. La lecture se fait de gauche à droite puis de haut en bas.....	70
Tableau 5 : Concentration ( $\mu g\ g^{-1}$ ) of pentacyclic triterpenes in parts of <i>Panicum miliaceum</i> (n.d., not detected).....	81
Tableau 6: Concentration ( $\mu g\ g^{-1}$ ) of pentacyclic triterpenes in <i>Panicum miliaceum</i> (n.d., not detected).....	84
Tableau 7 : Inventory of pentacyclic triterpenes in <i>Panicum</i> , <i>Pennisetum</i> and <i>Setaria</i> species. X indicates that the compound was detected in the extract. ....	87
Tableau 8 : Inventory of millet plant samples by stand together with plant height, panicle weight, weight of 20 seeds, miliacin concentration in seeds and miliacin $\delta D$ values and standard deviations of miliacin extracted from seeds. Average and standard deviation of miliacin $\delta D$ values by stand are calculated as the arithmetic average and standard deviation of miliacin $\delta D$ values of plants developed on the same stand. n represents the number of replicates per sample in GC-irMS.....	103
Tableau 9 : Valeurs $\delta D$ moyen annuel pondéré des précipitations et $\delta D$ de la miliacine (‰ V-SMOW). (L) correspond aux graines fournies par la Société Leplâtre, (M) correspond aux graines récoltées dans le champ de Mézières. ....	113
Tableau 10 : $\delta D$ miliacine ( $\delta D_{mil}$ ) en fonction de l'année de récolte du millet et $\delta D$ des précipitations mensuelles pondérées. Les valeurs isotopiques sont exprimées en‰ V-SMOW. ....	114
Tableau 11 : Fractionnement biosynthétique apparent entre la miliacine et les eaux de pluie selon la formule présentée en équation 1 avec l'écart-type de la moyenne entre les différentes années pour chaque fractionnement biosynthétique apparent calculé.....	114
Tableau 12 : Descriptif du profil des deux carottes prélevées dans le champ de Mézières. ....	116
Tableau 13 : Valeurs de $\delta^{18}O$ et $\delta D$ des eaux météoriques (exprimés en‰ V-SMOW) et hauteur d'eau mesurées par le BRGM dans les précipitations antérieures au prélèvement des carottes.....	118
Tableau 14 : Valeurs $\delta D_{miliacine}$ (en‰ V-SMOW) de deux variétés de millet sur trois sites chinois.....	131
Tableau 15: $\delta D$ and $\delta^{18}O$ values of water in the hydroponic solution and in transpirative and non-transpirative organs during experiments in Rubic1 and Rubic5. HS=hydroponic solution; R=roots; LX=leaf X (Leaves are numbered from bottom to top); C=first internode / collet; IN LX=internode between leaf X-1 and leaf X; P=panicle.....	141
Tableau 16: $\delta D$ values of miliacin and $n$ -alcane extracted from <i>P. miliaceum</i> seeds collected after cultivation in Rubic1 and Rubic5 climatic chambers. ....	143
Tableau 17: Apparent ( $\epsilon_{app}$ ) and net ( $\epsilon_{net}$ ) biosynthetic fractionation for miliacin and $n$ -alcane, calculated from equation 1 and equation 2, in Rubic 1 (61 % relative humidity) and Rubic 5 (74 % relative humidity). Biosynthetic fractionations are calculated from panicles water (PW; see Table 1) $\delta D$ values since it is supposed to be the water from which $n$ -alcane and miliacin were produced in seeds. ....	147





# CHAPITRE I – INTRODUCTION

## A. Contexte général

### 1. Changement climatique actuel et questions posées sur le futur

Le climat est un système d'interactions complexes entre atmosphère, hydrosphère, cryosphère et biosphère (IPCC, 2007) qui semble avoir été perturbé par les activités humaines comme l'indique l'augmentation récente de la température, considérée comme anormale (c'est-à-dire en dehors d'une gamme et d'un rythme explicable par des causes naturelles seules ; Figure 1).

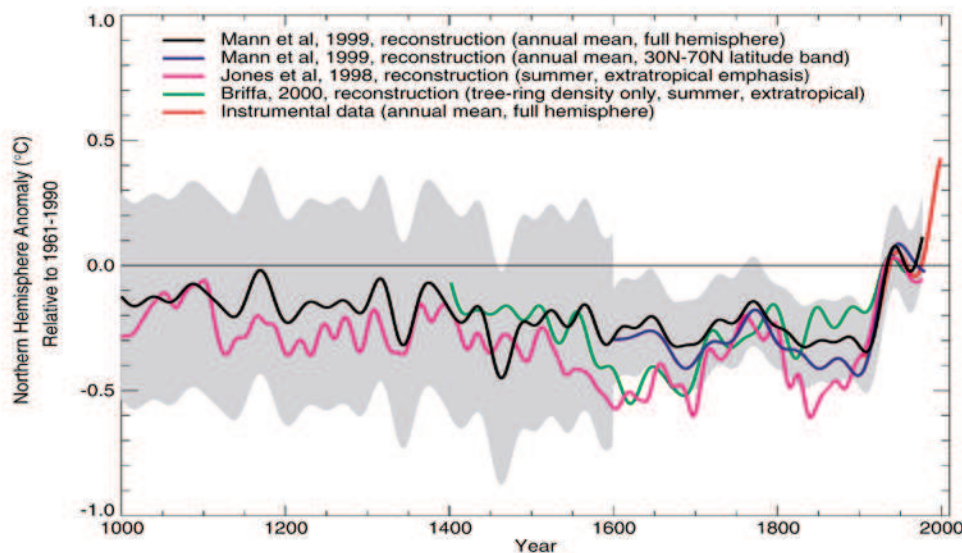
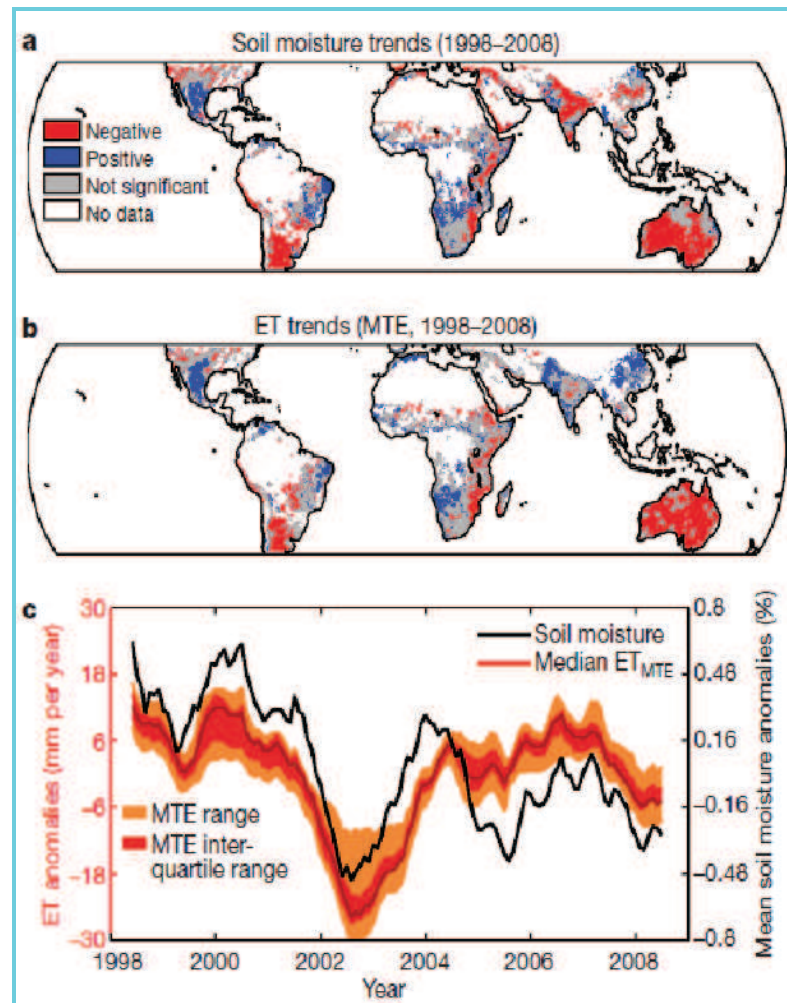


Figure 1 : Evolution des anomalies<sup>1</sup> de température depuis l'an 1000 comparées à la moyenne de 1961-1990 dans l'hémisphère nord, Figure 2.21 de l'IPCC report 2007.

L'élément commun aux compartiments qui interagissent au sein de la machinerie climatique est l'eau qui est l'un de ses rouages essentiels à travers les transferts de matière et d'énergie. Il existe donc un lien très étroit entre climatologie et hydrologie. En d'autres termes, un changement climatique se traduit de manière systématique par un changement dans le cycle hydrologique (IPCC, 2007 ; Dansgaard, 1964 ; Gleixner et Mügler, 2007). Les changements climatiques et hydrologiques ont eu, à travers les temps géologiques, des conséquences majeures sur l'évolution des milieux continentaux (voir par exemple Finney et al., 2002 ; Liu et Yang, 2010) et, au moins durant l'Holocène, des impacts significatifs sur l'évolution des sociétés humaines (i.e. Tinner et al., 2003 ; Turney et al., 2006 ; Magny et al., 2009).

<sup>1</sup> Anomalie : différence entre la moyenne des températures mesurées sur X années et la température mesurée au temps t.

Le changement climatique actuel se traduit par exemple par des extrema de températures (Thomson, 1995 ; Stine et al., 2009) mais également par des modifications de l'humidité des sols et de l'évapotranspiration (Jung et al., 2010 ; Figure 2).



**Figure 2 : Evolution de l'humidité relative de 1998 à 2008 dans le monde. a) Tendance de l'humidité moyenne au sol ; b) Tendance de l'évapotranspiration ; c) Evolution des anomalies de l'évapotranspiration globale de 1998 à 2008 (d'après Jung et al., 2010).**

La végétation naturelle n'est, bien entendu, pas la seule pouvant être affectée. Les plantes cultivées sont également impactées puisque d'importantes conséquences sont à prévoir sur les agrosystèmes (Levrault, 2010 ; Rosenzweig et Parry, 1994). Les conséquences d'un changement climatique sur les plantes cultivées pourraient donc directement affecter les sociétés humaines, via des diminutions ou augmentations du rendement, un décalage des dates de récolte... Les mécanismes d'adaptation des sociétés aux changements à venir (via, par exemple, un changement de plantes cultivées ou un décalage des dates de semis et récoltes ; Levrault, 2010) doivent s'inspirer des expériences passées, c'est-à-dire des changements climatiques qui sont

survenus dans des temps plus ou moins reculés et des impacts que ces changements ont eu sur les écosystèmes et les populations.

L'étude présentée dans ce manuscrit participe à un effort général qui vise à évaluer l'ampleur des changements climatiques passés et les impacts qu'ils ont pu avoir sur les sociétés humaines anciennes et ceci afin d'anticiper les conséquences du changement climatique actuel et de proposer des solutions d'adaptation (Rosenzweig et Parry, 1994 ; IPCC, 2007). L'approche rétrospective fournit des données qui alimentent et contraignent les modèles numériques afin de simuler *in silico* les conséquences du changement climatique actuel. Les modèles sont en effet peu documentés pour le milieu continental (Terray et al., 2010), alors que les écosystèmes continentaux concernent au premier plan les sociétés humaines qui les exploitent ou y vivent.

## **2. Changement climatique et changement hydrologique**

L'eau est un élément clé du système climatique à travers ses diverses propriétés : contribution à l'effet de serre, à l'albédo selon qu'elle est sous forme vapeur/liquide (nuage) ou glace/neige, aux transferts de chaleur, de solutés et de particules (Pierrehumbert, 2002 ; Le Hir et al., 2007). Ainsi, toute modification dans le cycle hydrologique aura un impact sur le cycle climatique et réciproquement. L'exemple le plus marquant d'une variation climatique associée à un changement radical du cycle hydrologique est le concept de « Snowball Earth », en français, la terre boule de neige (Figure 3), qui a été mis en évidence à partir de la présence de sédiments d'origine glaciaire sur tous les endroits du globe il y a quelques 600-700 millions d'année (Hoffman et al., 1998).

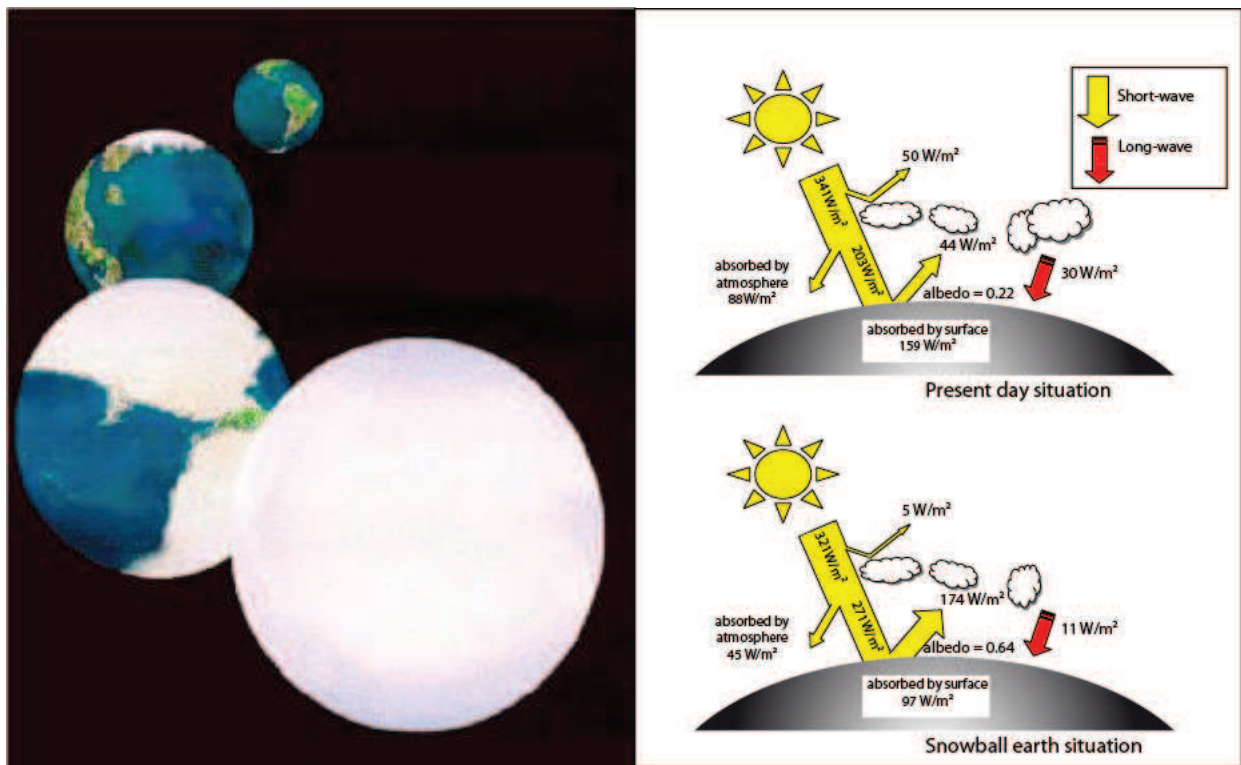


Figure 3 : A. Vue d'artiste de la glaciation totale du globe terrestre. (Crédit : Université de Bristol) B. Climat et bilan radiatif aujourd'hui et lors de la terre boule de neige, rôle de l'eau (tiré de Le Hir et al., 2007).

Ce type de transition climatique, bien qu'illustrant de manière extrême le lien entre climat et eau, s'est produit à l'échelle des temps géologiques, c'est-à-dire des échelles de temps de plusieurs millions d'années (Pierrehumbert, 2004), temps qui sont imperceptibles à l'échelle d'une génération humaine.

L'Holocène (les 10 derniers milliers d'années) est une période classiquement considérée comme stable d'un point de vue climatique, notamment lorsqu'elle est comparée aux épisodes glaciaires et interglaciaires qui se sont succédés durant le Quaternaire. Ainsi, alors que les différences de température entre périodes glaciaires et interglaciaires peuvent atteindre plus de  $15^\circ\text{C}$  (Berger, 1992), la courbe de température de l'Holocène est remarquablement stable (Figure 4).

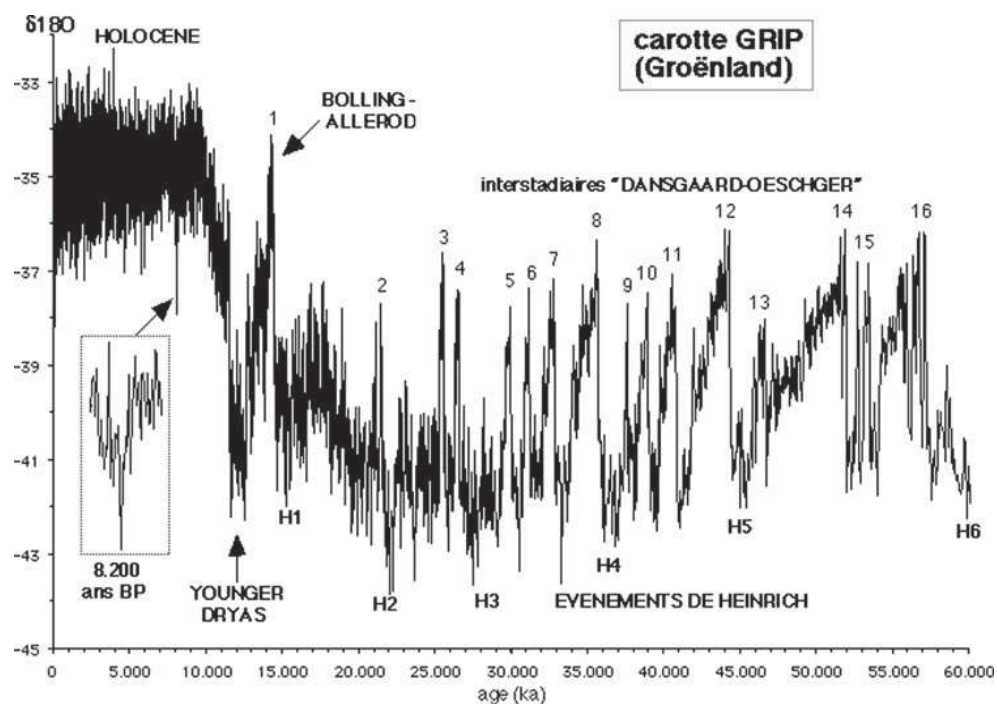
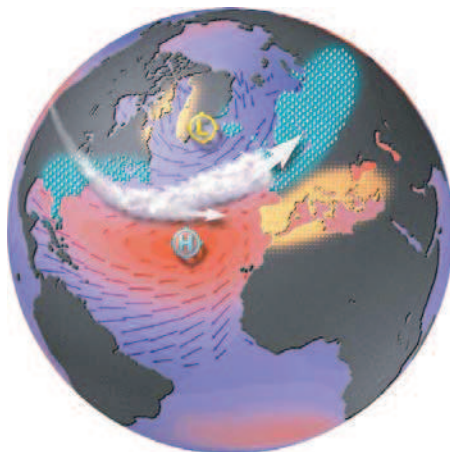
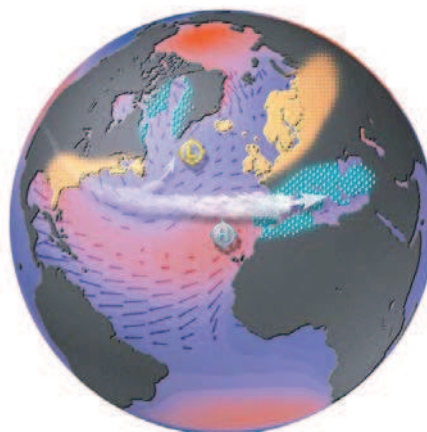


Figure 4 : Evolution temporelle de la composition isotopique ( $\delta^{18}\text{O}$ ) de la glace du Groenland (Johnsen et al., 1997).

L'Holocène a pourtant été ponctué de nombreux événements climatiques, comme la surprise climatique datant de 8 200 ans, et de variabilités qui semblent plus ou moins périodiques (Broecker, 1997 ; Alley et Agustsdottir, 2005).

Pour les périodes les plus récentes, les climatologues s'accordent à définir des modes de variabilités (moussons africaine et asiatique ; oscillation australe, oscillation nord-Atlantique – NAO) qui sont le jeu d'interactions entre l'océan et l'atmosphère et qui modulent la météorologie et le climat de différentes zones du globe terrestre. Par exemple, la NAO est définie par un indice annuel calculé à partir de différences de pression entre l'Islande et les Açores (voir Hurrell, 1995 ; Figure 5). Elle est également décrite au jour le jour par la distribution des masses d'air en Atlantique Nord. Les modes  $\text{NAO}^+$  ou  $\text{NAO}^-$  vont contrôler la trajectoire des vents d'ouest et donc agir sur la distribution des précipitations en Europe (Hurrell, 1995 ; Cane, 2005).



**NAO<sup>+</sup>****NAO<sup>-</sup>**

**Figure 5 : Les deux phases de la NAO<sup>2</sup>, leurs conséquences sur le trajet des vents d'ouest, et sur la distribution des précipitations en Europe. Source : Lamont Doherty Earth Lab.**

Les variations d'intensité de la mousson ou les variations de précipitations dues aux oscillations impacteront directement les organismes vivants dans les zones sous influence de la mousson (Holmgren et al., 2001).

Les changements climatiques lointains ont eu des conséquences sur les êtres vivants en général, qu'en est-il sur les êtres humains depuis l'Holocène ?

### **3. Quelques exemples d'interactions passées entre climat et sociétés**

A travers tous les continents, les phases de croissance et de déclin des civilisations ont été interprétées comme résultant d'ouvertures et de fermetures de niches écologiques qui ont résulté de modifications de la disponibilité des ressources naturelles (IPCC, 2007 ; Terray et al., 2010 ; Lite et al., 2005) résultant, dans certains cas, de changements climatiques (Binford et al., 1997 ; Yasuda et al., 2004 ; Terwilliger et al., 2012 ; IPCC, 2007 ; Terray et al., 2010 ; Lite et al., 2005). Deux civilisations se développant sur un même site seront ainsi en concurrence pour les ressources de la même façon que les autres espèces vivantes. Un des cas les plus marquants de civilisations en concurrence est celui de l'île de Pâques. Cette île située dans le Pacifique, a subi une première colonisation pendant le premier millénaire (colonisation polynésienne) avant une colonisation européenne lors du 18<sup>ème</sup> siècle (découverte par les européens le 5 avril 1722). Cette île étant isolée, les ressources disponibles pour les populations sont restreintes et les différentes civilisations sont en concurrence pour ses ressources (Mann et al., 2008). Avant l'apparition des Hommes-Oiseaux sur cette île (à partir du 14<sup>ème</sup> et jusqu'au 18<sup>ème</sup> siècle), une période de

<sup>2</sup> NAO : North Atlantic Oscillation ou Oscillation Nord-Atlantique. Elle correspond à la différence de pression atmosphérique entre l'anticyclone des Açores et la dépression d'Islande et correspond donc à la différence de pression entre Lisbonne (Portugal) et Reykjavik (Islande).

sécheresse affecta la disponibilité des ressources naturelles, en particulier le bois, avec des arbres se raréfiant du fait d'un mauvais renouvellement et d'une exploitation par l'homme afin de construire des bâtiments. Afin de ne plus surexploiter les ressources de l'île, il fut décidé d'allouer principalement les ressources à un clan. Une compétition fut ainsi mise en place qui voyait s'affronter des représentants des différentes tribus et dont le vainqueur était désigné Homme-Oiseau. Le clan du vainqueur se voyait allouer l'utilisation des ressources environnementales (œuf d'oiseaux, bois et terres arables) jusqu'à la prochaine compétition. Cependant ce procédé n'a pas empêché le déclin de la civilisation de l'île de Pâques. La question est donc de savoir si ce déclin résulte d'une réduction des ressources naturelles du fait d'un changement climatique (Mieth et Bork, 2010 ; Mann et al., 2008) ou d'un épuisement des ressources naturelles par les activités humaines (Mieth et Bork, 2010).

En Ethiopie, Terwilliger et al. (2012) ont montré une corrélation entre des phases de changements hydrologiques et les crises sociétales telles que les phases de déclin des Royaumes. Ces mêmes types de corrélation ont pu être mis en évidence en Chine, avec les travaux de Zhang et al. (2006) qui ont montré que les variations d'intensité de la mousson d'été sont corrélées à la variabilité solaire, aux températures de l'hémisphère Nord et de Chine, au retrait des glaciers, mais aussi aux changements des dynasties chinoises (Figure 6). La plupart des changements de dynastie sont survenus lors de périodes de sécheresse et/ou d'intensité de moussons moins importantes telles que retranscrites dans une stalagmite par des valeurs de  $\delta^{18}\text{O}$  qui augmentent.



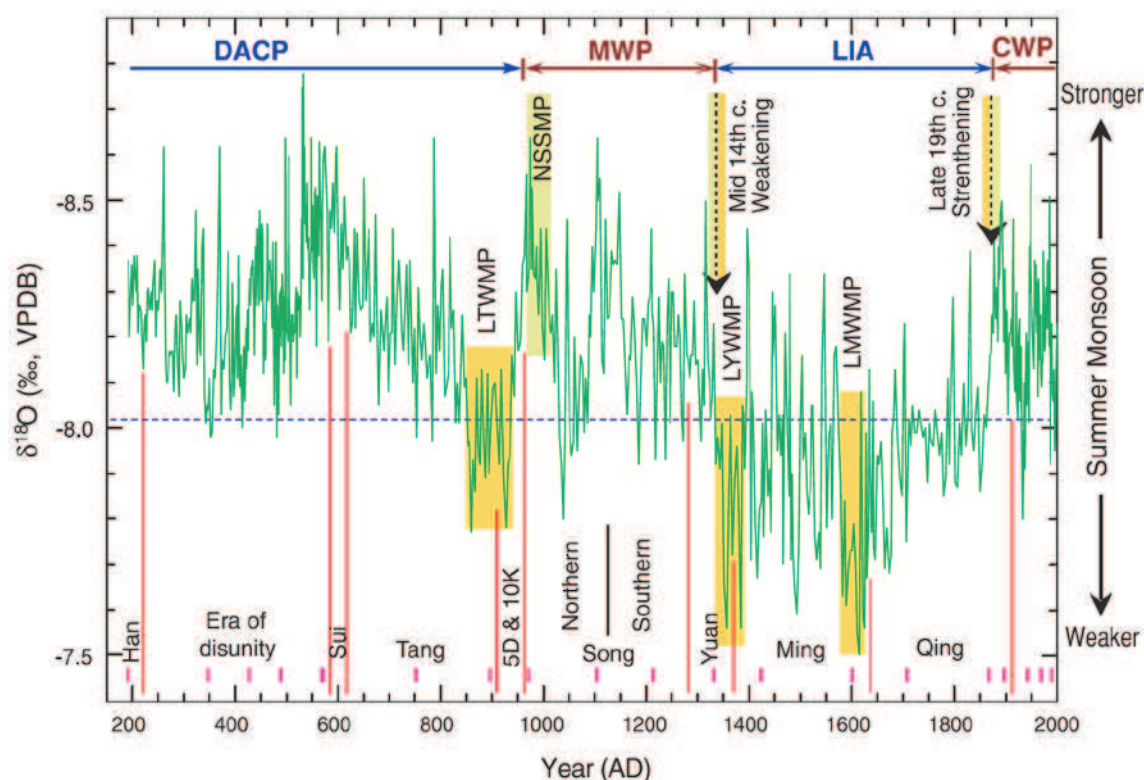


Figure 6 : Evolution des dynasties chinoises au regard du  $\delta^{18}\text{O}$  d'une stalagmite prélevée dans la grotte de Wanxiang qui reflète l'intensité de la mousson asiatique d'été (d'après Zhang et al., 2008).

Une autre étude de Zhang et al. (2006) a montré que, durant les 1000 dernières années, les changements de dynastie et les périodes de guerres coïncident avec des périodes de basse température (Figure 7 et résumé dans le Tableau 1). Ces auteurs montrent que, malgré une augmentation générale de la population en Chine, certains événements peuvent impacter ponctuellement la démographie. Ces événements sont synchrones de diminution de températures (température reconstituée à partir du  $\delta^{18}\text{O}$  de la stalagmite de la grotte d'Hulu), le nombre de guerres ayant tendance à augmenter lors de phases froides (Figure 7 et Tableau 1). L'hypothèse principale est que la diminution en ressources (récolte) engendre des conflits et des changements dynastiques.

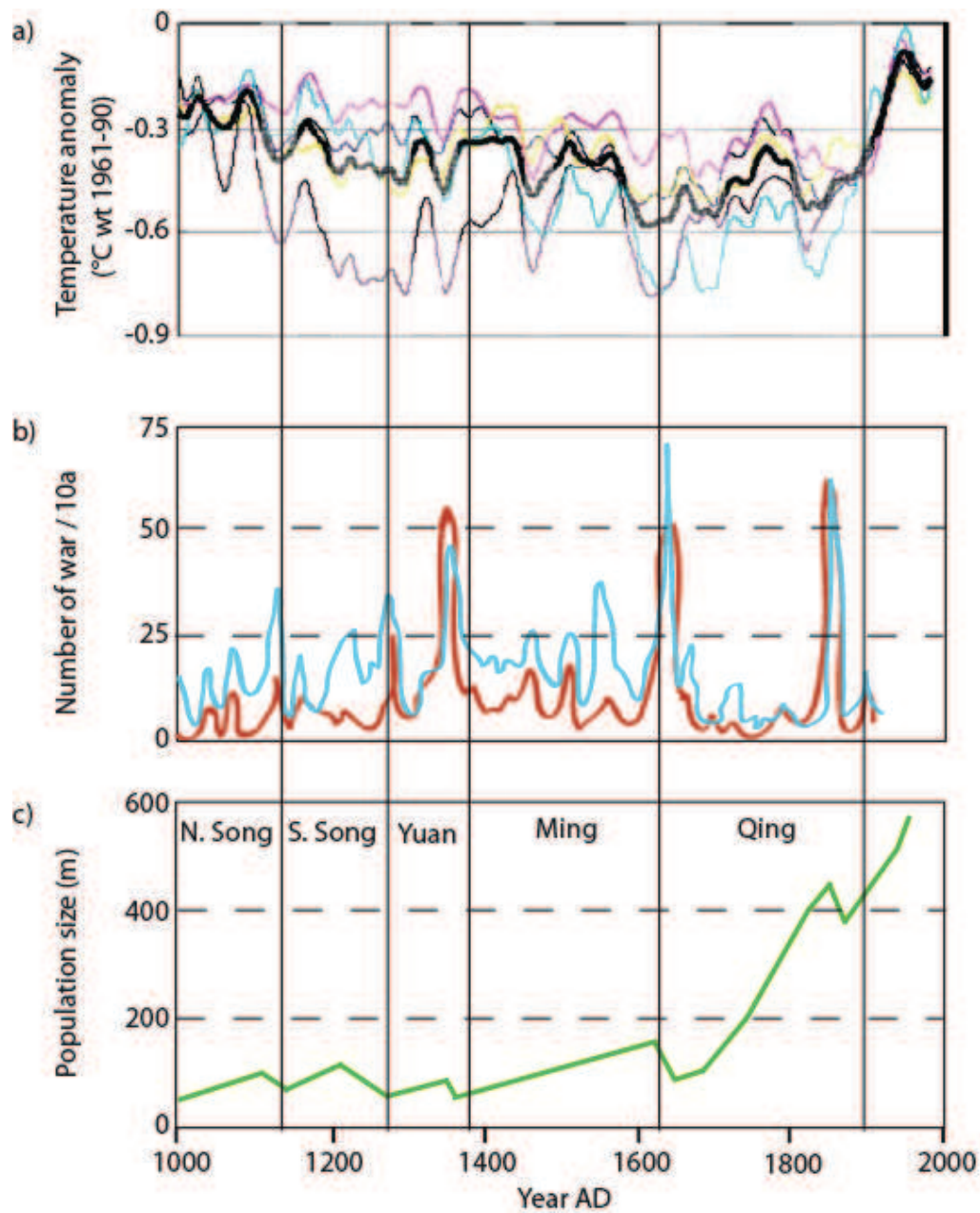


Figure 7 : Evolution des dynasties chinoises au cours des 1000 dernières années. a) Température reconstituée à partir du  $\delta^{18}\text{O}$  de la figure 6 ; b) Nombre de guerres documentées ; c) Taille de la population.

Tableau 1 : Relations entre phases climatiques, guerres et changements de dynastie (Zhang et al., 2006).

Year (AD)	Average temperature anomaly (°C)	Climatic phases	Number of wars	War ratios	Dates of dynastic changes (AD)
1000-1109	-0,252	Warm	135	1,23	
1110-1152	-0,368	Cold	93	2,16	Establishment of Jin (1115), collapses of North Song (1127) and Liao (1125) dynasties
1153-1193	-0,315	Warm	41	1	
1194-1302	-0,419	Cold	252	2,31	Establishment of Great Mongol (1206) and

Yuan (1271), collapses of Jin (1234) and South Song (1279) dynasties					
1303-1333	-0,362	Warm	33	1,07	
1334-1359	-0,454	Cold	90	3,46	
1360-1447	-0,345	Warm	189	2,15	Establishment of Ming and collapse of Yuan (1368)
1448-1487	-0,461	Cold	89	2,23	
1488-1582	-0,392	Warm	208	2,19	
1583-1717	-0,534	Cold	266	1,97	Establishment of Qing (1636) and collapse of Ming (1645)
1718-1805	-0,413	Warm	72	0,82	
1806-1912	-0,456	Cold	204	1,93	Establishment of the Republic of China and collapse of Qing (1911)

Ces crises, en lien étroit avec une modification de la disponibilité des ressources indispensables au bon développement d'une société (nourriture apportée par les cultures) ont permis à l'homme de développer de nouvelles stratégies afin de s'adapter, que ce soit par des avancées technologiques (Smit, 1993 ; Smithers et Smit, 1997) ou par des techniques d'esquive, comme le fait de choisir la culture d'une plante plus adaptée au nouvel environnement (Burton et al., 1997 ; Smithers et Smit, 1997 ; Handmer et al., 1999).

Plus proche de nous, les changements climatiques et variabilités météorologiques sont très largement étudiés dans les scénarii économiques. Ainsi, des entreprises telles que Total suivent-elles avec attention l'évolution de l'Oscillation Australe (El Nino, La Nina) afin d'identifier de manière anticipée les sources d'approvisionnement en huile de colza les plus économiques.

S'il existe de nombreux exemples invoquant une cause climatique pour expliquer des modifications des écosystèmes (faune, flore...) et des sociétés humaines, le lien reliant causes et effets n'est pas toujours simple à établir. En particulier, des causes intrinsèques aux systèmes naturels et anthropiques, indépendantes des variations climatiques, peuvent également expliquer ces modifications. Par exemple, pour l'île de Pâques, un débat persiste pour savoir si la réduction des ressources, en particulier des arbres, est due à un changement climatique (Mann et al., 2008) ou à une pression anthropique croissante (Mieth et Bork, 2010), les deux ayant une tendance à évoluer de façon synchrone puisque l'homme est assujéti aux changements climatiques au même titre que l'environnement. Puisque l'homme impacte l'environnement et est impacté par les changements environnementaux, il est possible de déterminer si, dans ce cas, la raréfaction des arbres est due au changement climatique ou à une pression anthropique plus forte.

La difficulté pour relier de manière certaine une cause climatique à un impact sur les sociétés tient en partie à l'origine différente des types d'informations. L'évolution des climats anciens est plutôt le domaine des paléoenvironmentalistes alors que l'étude des sociétés humaines anciennes le fait des archéologues, voire des historiens. Ainsi, dans la plupart des cas, les évolutions temporelles des changements sociétaux sont déconnectées de l'évolution des changements environnementaux et ils ne sont que mis en vis-à-vis sans forcément établir de lien direct entre eux. Ce qui veut dire qu'en plus des incertitudes de mesure et de quantification des paramètres sociétaux, économiques ou physiques, une incertitude temporelle (liée à la résolution temporelle des archives, ou à des trames chronologiques distinctes) est surimposée. Il est donc difficile d'invoquer soit le climat comme responsable unique d'un changement environnemental, ou à l'inverse, l'action de l'homme, ou encore les deux (Figure 8), climat, société et environnement étant trois compartiments étroitement imbriqués avec des actions et rétroactions les uns sur les autres.

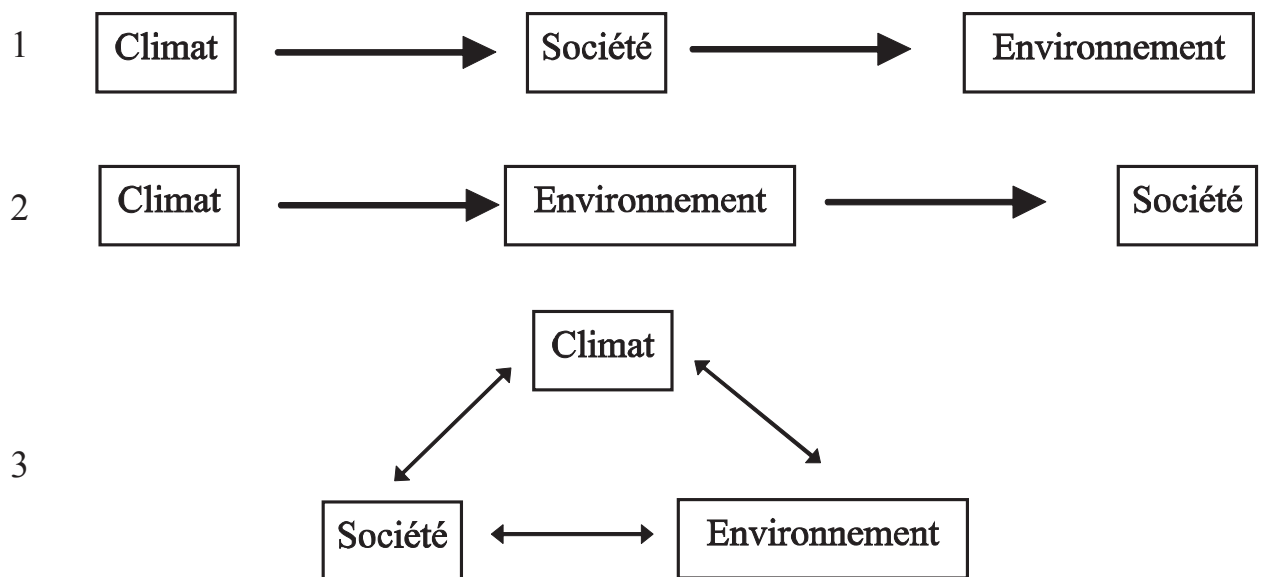


Figure 8 : Types d'interactions possibles entre Climat, Société et Environnement.

La partie suivante discute des moyens d'établir des liens de causalité entre les changements environnementaux et les changements sociétaux.

## B. Comment reconstruire les changements climatiques/hydrologiques passés et établir leurs relations avec l'évolution des sociétés humaines.

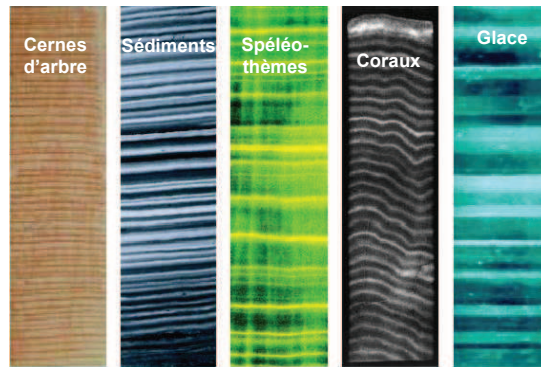
Pour reconstituer les changements climatiques et leurs conséquences sur les sociétés humaines, il faut donc disposer de données permettant de confronter conjointement l'évolution des sociétés, des écosystèmes et du climat. Pour les périodes les plus récentes, ces données sont facilement accessibles (données démographiques, économiques, sociales ; données climatiques

acquises à haute résolution ; inventaires botaniques, recensements agricoles...). Pour les périodes plus reculées, en l'absence de données textuelles ou numériques, il faut avoir recours à des archives dans lesquelles peuvent être conservés des témoignages de l'évolution du climat, des écosystèmes et des sociétés.

Nous allons voir dans un premier temps les différents types d'archives, dans un deuxième temps les différents types de traceurs, puis nous détaillerons la famille de traceurs utilisés dans ces travaux et enfin on détaillera le projet dans lequel cette thèse s'inscrit en précisant sur quels sujets plus précisément ces travaux sont intervenus.

## 1. Les archives des changements environnementaux.

Cinq types archives sont classiquement utilisées pour reconstituer des changements intervenus en domaine continental (qui est d'intérêt immédiat pour les sociétés humaines): les troncs d'arbres, les sédiments/sols/tourbes, les spéléothèmes, les coraux et enfin la glace (Figure 9).



**Figure 9 : Exemples d'archives qui permettent de retracer l'évolution des paléoenvironnements en domaine continental.**

Ces archives résultent de l'accumulation dans le temps de matières minérales et organiques dont la production est supposée être réalisée de manière quasi-synchrone avec la construction de l'archive. Aussi, les éléments constitutifs de l'archive sont-ils considérés comme des témoins des conditions environnementales qui régnaient au moment de la construction de cette archive (dépôt de sédiment, production d'un cerne d'arbre, accumulation de tourbe...).

Les modalités mêmes de construction de l'archive peuvent renseigner sur les conditions environnementales. Ainsi, le taux de croissance (nombre, rapprochement des cernes /strates...des arbres - Margolis et al., 2011 ou des coraux - Lough et Barnes, 1989), le nombre et l'amplitude des dépôts de crue dans les lacs (Benito et al., 2010) sont indicatifs des conditions climatiques de l'époque de la genèse des cernes/strates/couches.

A l'aide de différents outils de datation ( $^{14}\text{C}$ , évènements historiques, datation relative,...) il est possible d'établir une relation entre la profondeur du sédiment ou le nombre de cernes d'arbres et l'âge du dépôt considéré. Du nombre de couches / cernes / strates par unité de temps dépend la résolution de l'archive et donc l'échelle de temps qui pourra être investiguée. Les cernes d'arbres, couches de glace, coraux, spéléothèmes permettent dans des cas favorables, d'espérer des résolutions de l'ordre de l'année, voire de la saison. Les sédiments lacustres également, quand le taux de sédimentation est suffisant. En revanche, les sols n'ont pas de structuration temporelle par



accumulation ou agrégation. Obtenir des chroniques de l'évolution des changements environnementaux à partir de sols est donc plus ardu.

L'inconvénient majeur de toutes ces archives est leur rareté, la glace est restreinte aux hautes latitudes ou aux hautes altitudes. Le développement des spéléothèmes nécessite également des conditions particulières (Couchoud, 2008). Les arbres, s'ils permettent une très bonne résolution chronologique, couvrent au mieux les quelques derniers milliers d'années. A quelques exceptions près, et considérant leurs spécificités, ces archives ne permettent que rarement de retracer de manière continue l'évolution des sociétés humaines. Cependant, toutes ces archives continentales enregistrent les conditions climatiques d'un assez large panel des environnements près desquels l'homme a vécu. Ceci permet une intercalibration des modèles sur une multitude de lieux.

Au total, les archives qui semblent les plus pertinentes pour confronter l'évolution climatique, l'évolution des milieux et des activités humaines sont les archives lacustres. Dans des conditions favorables, celles-ci peuvent offrir une haute résolution chronologique et/ou un bon contrôle chronologique. Elles peuvent aussi préserver des indices/traceurs/proxies de l'évolution des climats et/ou des écosystèmes et/ou des activités humaines du bassin versant.

## **2. Les traceurs préservés dans les archives**

Les archives peuvent aussi enregistrer de manière indirecte des changements environnementaux, au moyen des nombreux traceurs qu'elles contiennent. Ces traceurs peuvent être de nature inorganique, tels l'eau (cf. infra pour le lien entre isotopes de l'eau et conditions climatiques), les gaz, ou les particules minérales stockées dans la glace ou dans les spéléothèmes, ou de nature organique (pollen, débris organiques...). Leur origine peut être abiotique (grains de quartz ou de calcite, bulles d'air emprisonnées dans la glace) ou biologique (coquilles de mollusques, graines, molécules organiques...). En ce qui concerne les sédiments lacustres, ils sont composés d'un ensemble organo-minéral provenant de tout un bassin versant et de la colonne d'eau.

### **a) Traceurs d'origine abiotique**

Certains éléments constitutifs des archives ont une origine "abiotique". Ils ne résultent pas directement d'une activité biologique. Par exemple, les dépôts de crue, caractérisés dans les sédiments lacustres par une minéralogie et une granulométrie distinctes de la sédimentation de fond (i.e. Debret et al., 2010), constituent des éléments déterminants pour reconstituer l'hydrologie du bassin versant (Arnaud et al., 2005 ; Benito et Thorndycraft, 2005 ; Czymzik et al., 2013). Les traces laissées par les migrations des glaciers (moraines par exemple), lorsqu'elles sont datées,

peuvent également permettre de reconstituer des variations hydrologiques ou de température (Luetscher et al., 2011). Dans la glace, les variations climatiques sont reconstituées à partir de la composition élémentaire ou isotopique de la glace, des bulles de gaz ou des phases minérales et organiques (Gabrielli et al., 2005 ; Raynault et Lorius, 2004 ; Landais et al., 2005 ; Burton et al., 2007). Ces traceurs, bien que donnant une indication sur les conditions hydrologiques, ne constituent que rarement des proxies (outil d'estimation quantitative d'une variable environnementale) et ne permettent pas d'estimer l'impact de variations environnementales sur les organismes vivants.

### **b) Traceurs organiques des paléovégétations**

L'organisme producteur des restes organiques (pollen, coquilles, graines...) peut parfois être identifié ce qui permettra, à partir de l'évolution des proportions de ces vestiges dans les sédiments, d'établir des successions des communautés biologiques, parfois en relation avec des changements climatiques (Zhao et al., 2012). Sur le même principe, certaines molécules organiques préservées dans différentes archives sont suffisamment spécifiques des organismes qui les ont produites pour être utilisées comme marqueurs des paléovégétations. Ils sont appelés biomarqueurs moléculaires (Shelfuss et al., 2005 ; Jacob et al., 2005; 2008; 2009). Parmi les molécules classiquement utilisées pour retracer les changements environnementaux (Castaneda et Schouten, 2011), les alcanes à chaînes longues sont classiquement considérés comme marqueurs de végétaux supérieurs (Vogts et al., 2012 ; Zech et al., 2012) ; les méthoxy-serratènes, marqueurs de Pinacées (Le Milbeau et al., 2013), les acétates de triterpényles, marqueurs d'Astéracées (Lavrieux et al., 2011).

Tous ces biomarqueurs retracent une évolution du biotope naturel pouvant servir de ressources aux sociétés humaines qui nous intéresse (expansion/régression de forêts). Or, des systèmes d'actions / rétroactions ont lieu entre la végétation et l'Homme (déforestation pour mise en culture des terres). L'utilisation de tels composés revient à faire de la palynologie/carpologie à une échelle moléculaire. Certains de ces biomarqueurs peuvent s'avérer être caractéristique d'une activité humaine, telle que le déboisement, avec ouverture du milieu et apparition de plantes de sous bois, marqueur de plantes cultivées... et donc permettre de déconvoluer les effets anthropiques des effets climatiques sur la végétation.

### **c) Traceurs de l'évolution des sociétés humaines**

Les sédiments lacustres archivent des indications des végétations naturelles qui se sont succédé dans le bassin versant. Selon le même principe, les matières minérales, végétales et animales résultant des activités des sociétés humaines peuvent être archivées et, de ce fait, permettre de retracer l'historique de ces activités. Les évidences d'activités humaines sont actuellement perceptibles sous diverses formes dans notre environnement immédiat (traces



médicamenteuses, résidus de plastiques dans les sédiments ; Pavoni et al., 2003 ; Evenset et al., 2007) ce qui est l'une des préoccupations environnementales majeures. En revanche, et exceptés les travaux en contexte fortement anthropisé, nous disposons de peu d'indications sur les activités humaines ayant affecté les écosystèmes à travers les pratiques ou la production de matières. Un nouveau champ de recherche s'ouvre donc visant à identifier des indicateurs univoques de ces activités (dont l'évolution dans les sédiments est uniquement attribuable à ces activités) permettant de retracer en continu leur évolution temporelle dans des archives. Parmi les outils connaissant un fort développement, les biomarqueurs moléculaires semblent, ici encore, très prometteurs.

Certains biomarqueurs des activités humaines, comme le coprostanol, sont des marqueurs directs puisque cette molécule provient du système digestif de l'homme. Néanmoins, elle est aussi retrouvée dans les fèces d'animaux d'élevage. Les variations qualitatives et quantitatives de ces molécules sont alors utilisées pour retracer les évolutions des cheptels (Jeng et al., 1996 ; Peng et al., 2002). Ce type d'approche est également utilisé en environnement estuarien afin de reconstituer l'évolution des stocks de poisson dans les nurseries historiques (Finney et al., 2002). D'autres biomarqueurs moléculaires, spécifiques de certaines plantes cultivées, peuvent témoigner, quand ils sont détectés dans les sédiments lacustres, de l'évolution des pratiques agricoles dans le bassin versant. C'est par exemple le cas de la miliacine, marqueur du millet cultivé (Jacob et al., 2008 ; 2009) ou d'autres éthers méthyliques de triterpènes pentacycliques qui tracent la culture de tapis de graminées à destination de terrains de football ou de golfs (Zocatelli et al., 2010). Enfin, le cannabinoïde détecté dans les sédiments du lac d'Aydat (Massif Central) a pu être interprété comme le résultat d'activités de rouissage des tiges de chanvre depuis le Moyen-Age (Lavrieux et al., 2013).

#### **d) Proxies des changements climatiques**

De la même manière, les archives recèlent des informations univoques et quantitatives sur l'évolution des variables qui définissent l'évolution des environnements, et notamment les variables climatiques. Il s'agit de traceurs particuliers qui constituent des indices d'approximation des variables climatiques, ou "proxies". Le développement de ces proxies est sans doute plus ancien que celui des traceurs d'anthropisation, en particulier du fait des développements considérables dans le cadre des études sur les archives marines et glaciaires depuis plusieurs décennies. Ils sont nombreux et très variables en fonction de l'archive considérée (spéléothèmes, sédiments, cernes d'arbres, coraux...) et des paramètres qu'ils approximent. Différents proxies peuvent être identifiés dans ces archives : les cernes de croissance d'arbres ou des coraux sont utilisés pour reconstituer les températures (Lough et Barnes, 1989 ; Margolis et al., 2011), les cernes d'arbres peuvent aussi être utilisés pour retrouver des stress hydriques (Rodriguez-Gonzalez et al., 2010). Le degré d'insaturation ( $U^k_{37'}$ ) des alcénones (cétones linéaires à longues chaînes) préservées

dans les sédiments marins est utilisé pour estimer la température des eaux de surface (Prah et al., 1988 ; Conte et al., 1992 ; Eglinton et al., 1992 ; Grimalt et Lopez, 2007 ; Müller et al., 1998). Plus récemment, l'indice TEX<sub>86</sub>, calculé à partir du degré de cyclisation d'éthers lipidiques de glycérol, a été également proposé pour estimer la température des eaux de croissance des organismes producteurs (Powers et al., 2004). Des températures peuvent aussi être estimées par la mesure du  $\delta^{18}\text{O}$  des tests de foraminifères benthiques (Duplessy et al., 2002) ou du  $\delta^{18}\text{O}$  de la glace (Jouzel et al., 2007).

### *(1) De la difficulté de quantifier des variables des climats du passé*

La quantification des variables au moyen de proxies nécessite une étape cruciale, qui est celle de la **calibration**. La calibration des proxies présents dans les archives du passé permet d'établir une relation mathématique entre le proxy et la variable qu'il quantifie, en supposant que cette relation n'ait pas évolué dans le passé. Cette calibration peut être réalisée par divers moyens. Tout d'abord en testant la réponse du proxy en fonction de gammes de variations du ou des paramètres auxquels il répond dans des conditions contrôlées (ex. chambres climatiques). Par exemple, Hou et al. (2008) ont pu établir l'impact de variations d'humidité sur le  $\delta\text{D}$  de molécules organiques produites par des plantes. Ces gammes de variations peuvent également être celles constatées dans des environnements naturels. Par exemple, l'établissement des relations mathématiques entre le TEX<sub>86</sub> (ou le  $\text{U}^{\text{k}}_{37}$ ) et les températures de surface de l'océan s'appuie sur la comparaison des valeurs de ces indices dans les sédiments superficiels prélevés sous différentes latitudes avec les températures mesurées en surface. De même, Huang et al. (2002), Sachse et al. (2006) et Hou et al. (2008) ont établi des corrélations entre précipitations et  $\delta\text{D}$  de molécules organiques préservées dans des sédiments superficiels lacustres répartis sur des gradients de température et de précipitations.

Enfin, une calibration peut être réalisée par comparaison avec un autre proxy déjà établi. Ces intercalibrations permettent ensuite des comparaisons de différents sites lorsqu'un seul des proxies est présent / analysable. Par exemple, Quillmann et al. (2012) ont calculé la température régnant lors de la formation des tests de *Cibicides lobatulus* à la fois à l'aide du  $\delta^{18}\text{O}$  et du rapport Mg/Ca de ces tests. La multiplicité des proxies s'explique par l'absence des phases porteuses de ces proxies qui soient ubiquistes.

### *(2) Température et hydrologie*

Les modèles climatiques établissant des prédictions pour le climat futur ont besoin de paramètres d'entrée, lesquels sont le plus souvent la température, et quelques paramètres hydrologiques tels que la quantité de précipitation, l'humidité... Or la température et l'hydrologie sont intimement liées (Boyer et al., 2010), le cycle de l'eau étant éminemment dépendant de la température lors de deux étapes cruciales, celle de l'évaporation et celle de la condensation (Dansgaard, 1964 ; Jacob et Sonntag, 1991 ; Figure 10). La Figure 10 montre ce lien étroit existant

entre la température et les isotopes de l'eau des précipitations. Ainsi, plus la température augmente et plus le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau météorique<sup>3</sup> augmente. Une température élevée facilite l'évaporation de l'eau riche en  $^{18}\text{O}$ . Cette dernière a ensuite tendance à précipiter au plus proche de la source d'évaporation par rapport à une eau appauvrie en  $^{18}\text{O}$ . Nous développerons ce point ultérieurement. Toutefois on peut remarquer qu'une température annuelle moyenne peut être obtenue à partir du  $\delta^{18}\text{O}$  annuel moyen de l'eau météorique (Figure 10).

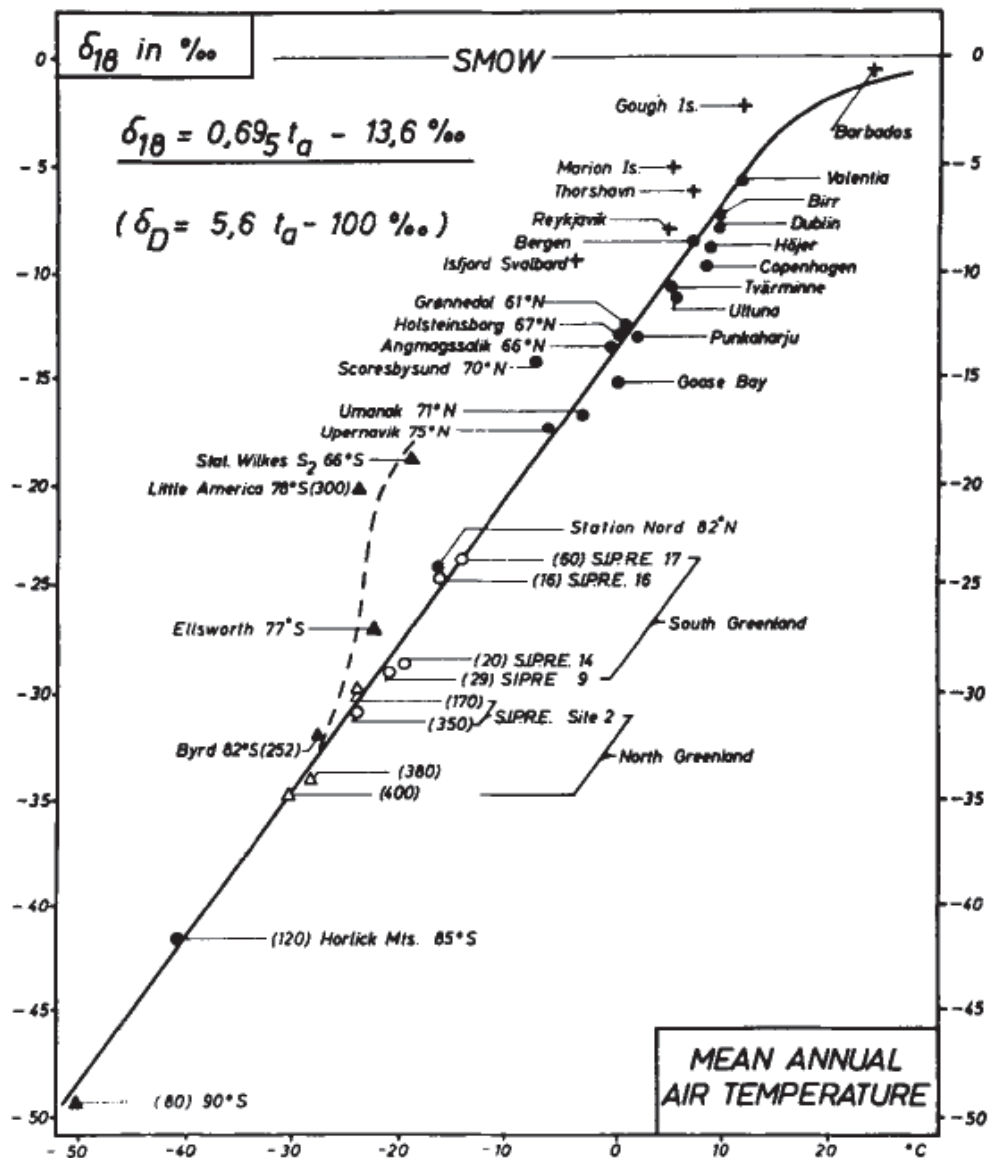


Figure 10 : Evolution du  $\delta^{18}\text{O}$  des précipitations en fonction de la température moyenne au sol (Dansgaard, 1964). L'appauvrissement progressif des précipitations avec la latitude/température, s'explique par la distillation de Rayleigh.

De la température d'évaporation dépendra la quantité d'eau évaporée ; plus il fera chaud et plus la quantité d'eau évaporée sera grande (Vardavas et Fountoulakis, 1996 ; Rosenberry et al.,

<sup>3</sup> L'eau météorique correspond à une moyenne dans le temps de l'eau provenant de plusieurs événements de pluie.

2007 ; Boyer et al., 2010 ; Helfer et al., 2012). Il en est de même pour les précipitations, plus la température de condensation sera basse et plus la quantité d'eau précipitée sera importante. Bien sûr, lors de ces processus, d'autres facteurs vont intervenir, comme le vent, qui pourra faciliter l'évaporation de l'eau, ou la topologie qui empêchera le transport d'une masse d'air sur des distances trop longue, sans oublier la saturation en vapeur d'eau à l'interface eau-atmosphère (Roderick et Farquhar, 2002 ; Helfer et al., 2012). Ces facteurs physiques ne sont pas les seuls à influencer l'hydrologie locale, différents types de végétation, dans un même lieu, dans les mêmes conditions initiales, n'auront pas les mêmes conditions, via, entre autres, des taux évapotranspiratoires différents (Lin et Wei, 2008). Nombre des exemples cités utilisent ainsi les isotopes de l'hydrogène et de l'oxygène afin de distinguer les origines des eaux, leur temps de formation, le lien qu'il existe entre eaux météoriques et eaux sous forme vapeur...

### **e) Isotopes de l'eau et climat**

#### *(1) Généralités*

L'eau est une molécule composée de deux atomes d'hydrogène et d'un atome d'oxygène. Chaque atome possède des isotopes qui diffèrent par le nombre de neutrons. Les isotopes radioactifs de l'oxygène, c'est-à-dire non stable, ont une demi-vie très courte, inférieure à deux minutes, ce qui les rend négligeables en termes d'abondance. Les trois isotopes stables de l'oxygène sont ceux de masse atomique 16, 17 et 18 avec une abondance naturelle respective de 99.76, 0.04 et 0.20% (Bassinot, 2007 ; Brenninkmeijer, 2003). La notation de ces isotopes est respectivement  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ . Dans la plupart des études, seuls les deux isotopes les plus abondants (de masse atomique 16 et 18) sont pris en compte (Craig, 1953, Bassinot, 2007) même si les récents progrès technologiques permettent de plus en plus de prendre en compte d'autres atomes tels que le  $^{17}\text{O}$  (Giauque et Johnson, 1929 ; Berkeley, 2000 ; Landais et al., 2007).

L'atome d'hydrogène a lui aussi plusieurs isotopes. Le tritium, de masse atomique 3, est radioactif alors que les isotopes stables de masse 1 (protium) et 2 (deutérium, D ou  $^2\text{H}$ ) sont stables. Les proportions des différents isotopes de l'hydrogène sont : <0.01% pour le tritium, de 0.15% pour D et de 99.85% pour H (Lewis, 1933 ; Rutherford, 1937 ; Brenninkmeijer, 2003).

Les différences massiques entre les isotopes de l'hydrogène (ou de l'oxygène) induisent des comportements différents. Par exemple, les molécules d'eau contenant du deutérium (ou du  $^{18}\text{O}$ ) condenseront-elles plus rapidement que celles qui en sont dépourvues (Dansgaard, 1964 ; Gleixner et Mugler, 2007). C'est ce qu'on appelle un fractionnement isotopique. Un autre fractionnement isotopique est réalisé par les organismes vivants. Ainsi, pendant la biosynthèse de molécules organiques, les isotopes légers sont privilégiés lors des réactions enzymatiques aux dépens des isotopes stables lourds (Park et Epstein, 1961 ; Sessions, 2006 ; Chikaraishi et al., 2004a,b, 2005, Sachse et al., 2012). Ces processus sont décrits en particulier pour l'hydrogène (Sessions et Hayes, 2005 ; Sessions et al., 1999) et sont appelés fractionnements biosynthétiques.

## (2) Conventions

Le choix de normes standardisées a été fait afin de pouvoir comparer les échantillons de différents laboratoires. Les unités sont en V-SMOW ou V-PDB, le "V" (pour Vienne, en Autriche, siège de l'IAEA) qui s'est ajouté devant les "SMOW" et "PDB" (voir plus loin) indique que la normalisation n'est plus directement réalisée sur les standards initiaux (échantillons épuisés) mais sur de nouveaux échantillons qui ont été calibrés à partir des standards originaux.

Les rapports isotopiques correspondent à la quantité en isotope lourd par rapport à l'isotope le plus léger. Considérant la surabondance des isotopes légers par rapport aux isotopes lourds, ces rapports sont en général très faibles dans les échantillons naturels. De fait, les variations entre différents échantillons sont également très faibles. La notation  $\delta$  (exprimée en pour mille) a été adoptée afin de limiter la manipulation de grands nombres et surtout de normaliser le rapport à un standard international (Figure 11).

$$\delta D_{\text{ech}} = \frac{R_{\text{ech}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \times 1000 \quad \text{où } R = \frac{\text{Nombre de D}}{\text{Nombre de H}}$$

Figure 11 : Notation du rapport isotopique de l'hydrogène d'un échantillon (ech : échantillon, std : standard).

Pour l'hydrogène et l'oxygène, le standard (V-SMOW pour Vienna-Standard Ocean Mean Water) est un échantillon reconstitué contenant des eaux distillées provenant des différentes eaux océaniques. Les teneurs en différents isotopes de ce standard sont données dans la Figure 12.

$^2\text{H}/^1\text{H}$	$= 155,76 \pm 0,1 \text{ ppm}$
$^3\text{H}/^1\text{H}$	$= 1,85 \pm 0,36 \text{ ppm}$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	$= 2\,005,20 \pm 0,43 \text{ ppm}$
$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	$= 379,9 \pm 1,6 \text{ ppm}$

Figure 12 : Rapports isotopiques des différents atomes de l'eau du standard V-SMOW, ppm = partie par million.

Pour les isotopes du carbone, les données sont exprimées en ‰V-PDB, le standard étant constitué de carbonates provenant de rostrum de Belemnite du site de Pee Dee.

## (3) Relations entre climat et isotopes

On a précédemment précisé que le cycle hydrologique est intimement lié au climat. Les isotopes des atomes constituant l'eau peuvent varier en fonction de différents paramètres comme

la température, la continentalité, l'humidité et bien d'autres (Dansgaard, 1964 ; Gleixner et Mugler, 2007 ; Figure 13).

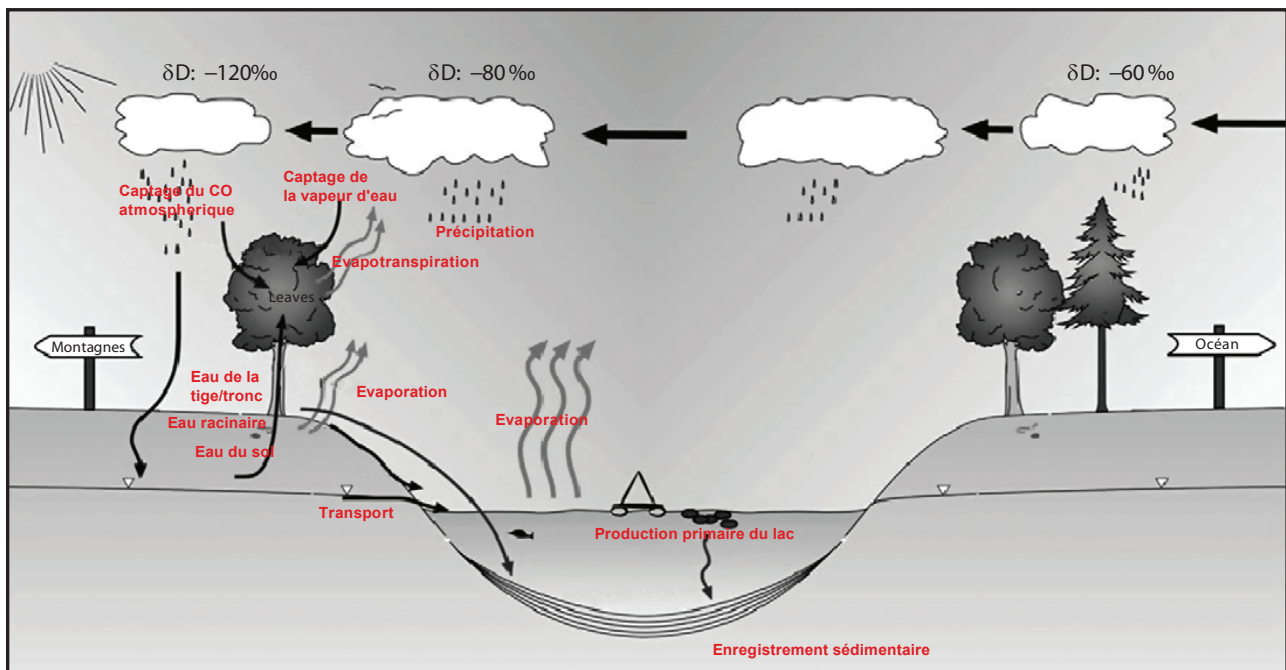


Figure 13 : Enregistrement du  $\delta D$  météorique dans la matière organique sédimentaire (Modifié d'après Gleixner et Mugler, 2007).

Les valeurs  $\delta D$  de l'eau de pluie sont plus élevées près de la source d'évaporation, en général, l'océan, ou toute grande étendue d'eau. Cette eau de pluie ou eau météorique si l'on considère une moyenne des événements de pluie (que ce soit à l'échelle mensuelle, annuelle, ou autre pas de temps enregistré) sera ensuite appauvrie au fur et à mesure de l'éloignement à la source (continentalité), du fait d'un appauvrissement progressif résultant de la précipitation préférentielle d'eaux enrichies. L'altitude a le même effet que la continentalité. Une eau précipitant en altitude sera ainsi plus appauvrie en D qu'une eau précipitant à une altitude inférieure (Dansgaard, 1964 ; Gleixner et Mùgler, 2007 ; Figure 9 et 13).

Les précipitations sur différents lieux suivent toutes le même principe, et, en mesurant le  $\delta D$  et le  $\delta^{18}O$  des précipitations à différents endroits, il a pu être déterminé que toutes les valeurs  $\delta D$  et  $\delta^{18}O$  des eaux météoriques suivaient une loi qui précisait l'enrichissement en D en fonction du  $^{18}O$  et réciproquement (Craig, 1961 ; Dansgaard, 1964). La droite météorique globale est de la forme:  $\delta D = 8 \delta^{18}O + 10$  (Craig, 1961 ; Dansgaard, 1964) et pourra être corrigée en fonction des localités.

Ces isotopes présents dans l'eau sont donc couramment utilisés pour reconstituer l'hydrologie locale actuelle (Dansgaard, 1964) et passée (Dansgaard et al., 1993). Cependant les



stalagmites et autres glaciers conservant ces isotopes ne sont pas présents dans tous les environnements, il faut donc trouver un autre support intégrant ce signal et le conservant.

#### (4) Archivage des rapports isotopiques des atomes de l'eau

La molécule d'eau issue des précipitations peut être préservée directement sous forme de glace. Les carottes de glace conservent alors un signal assez direct des conditions climatiques passées. C'est d'ailleurs grâce à ces carottes de glace qu'ont été identifiés les changements majeurs du climat ou que sont reconstituées les températures, en utilisant le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des glaces (Zhang et al., 2006 ; Zhang et al., 2008 ; Dansgaard et al., 1993). L'inconvénient majeur est que la glace n'est pas ubiquiste, mais surtout, elle n'est pas conservée dans tous les environnements. L'eau (et ses atomes constitutifs) peut également être utilisée pour la production de matières organiques par les producteurs primaires, lors de la photosynthèse (Figure 14).

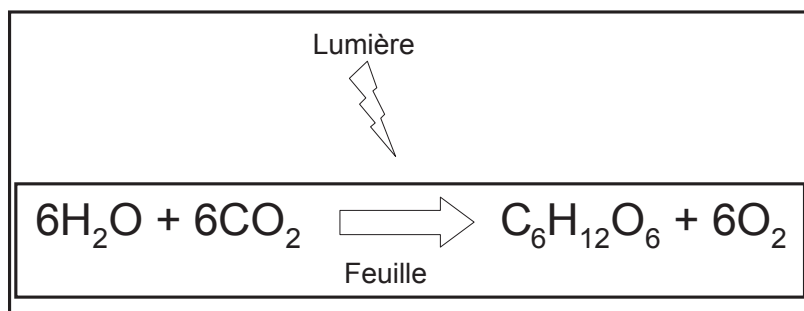


Figure 14 : Réaction de photosynthèse

La molécule de base pour les producteurs primaires est la molécule de glucose. La plante synthétisera cette molécule dans la feuille à partir d'eau et de dioxyde de carbone, lorsque ces photosystèmes seront stimulés par la lumière afin de lui fournir l'énergie nécessaire. De l'oxygène sera alors produit en même temps que la molécule organique. On peut remarquer que tous les atomes d'hydrogène de l'eau sont incorporés à la matière organique (via le glucose) alors que l'atome d'oxygène peut provenir soit de l'eau, soit du  $\text{CO}_2$ , une partie étant réémise sous forme d' $\text{O}_2$ . C'est pourquoi, dans la matière organique, l'atome d'hydrogène semble le plus pertinent afin de reconstituer des changements hydrologiques / climatiques.

Tout comme la glace enregistre les variations isotopiques de l'eau météorique, le  $\delta\text{D}$  de la matière organique (et en particulier celui de la cellulose) est utilisé depuis quelques décennies afin de reconstituer les changements hydrologiques, en partant du principe que le  $\delta\text{D}$  de la matière organique reflète celui des eaux météoriques (DeNiro et Epstein, 1981 ; Leaney et al., 1985 ; Marino et DeNiro, 1987 ; Sternberg et al., 1984). Cependant, cette matière organique est un

mélange de matières organiques produites par différents organismes, ayant chacun des fractionnements isotopiques distincts. Difficile alors d'espérer reconstituer quantitativement les variations du  $\delta D$  ou du  $\delta^{18}O$  des eaux météoriques. A l'inverse, si ces rapports sont mesurés sur des matières organiques plus spécifiques de leurs organismes source (cf. la partie sur les traceurs de paléovégétation), il doit alors être possible de quantifier plus précisément les variations hydrologiques.

### **3. Le $\delta D$ moléculaire**

La mesure du  $\delta D$  ou du  $\delta^{18}O$  sur des molécules individuelles suffisamment spécifiques de leurs organismes source (voir la partie sur les biomarqueurs) dans les sédiments doit permettre de mieux contraindre les fractionnements isotopiques entre l'eau météorique et la molécule. Il faut pour cela que ces fractionnements soient estimés ou mesurés et que les facteurs qui les contrôlent sont compris. Grâce aux développements techniques récents (couplage des méthodes de chromatographie gazeuse et d'un spectromètre de masse pour mesurer les ratios isotopiques, cf. chapitre 5), il est aujourd'hui possible de réaliser des mesures isotopiques sur des molécules individuelles.

#### **a) Principe**

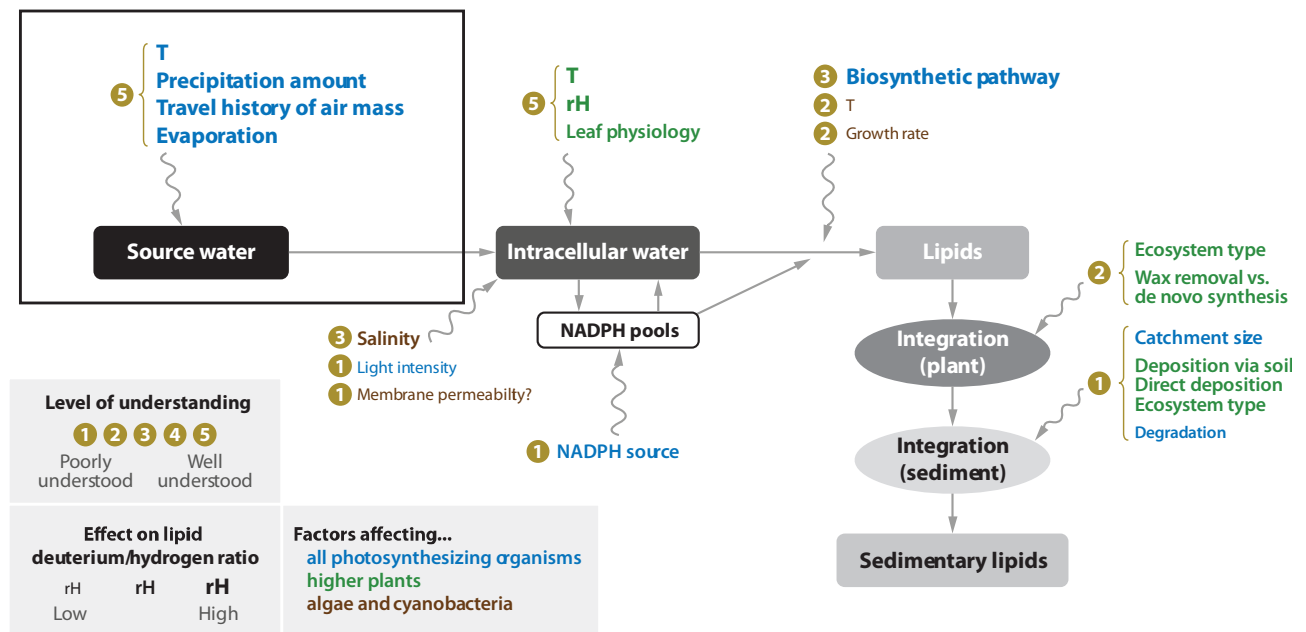
L'utilisation du  $\delta D$  moléculaire part d'un postulat simple : le  $\delta D$  moléculaire sera dépendant du  $\delta D$  de l'eau de pluie puisque les atomes d'hydrogène (ou de deutérium) des composés organiques proviennent tous de la photosynthèse (Figure 14). L'utilisation du  $\delta D$  moléculaire pour reconstituer le  $\delta D$  de l'eau météorique nécessite des précautions puisque d'autres facteurs que le  $\delta D$  de l'eau de pluie peuvent intervenir dans la relation qui les relie, relations que nous allons maintenant détailler. Ces facteurs sont importants à appréhender, puisqu'ils influent le  $\delta D$  moléculaire et donc la quantification des variations hydrologiques (Sachse et al., 2012).

Le  $\delta D$  des molécules produites par les autotrophes est principalement contrôlé par le  $\delta D$  de l'eau avec laquelle les molécules sont produites (Sachse et al., 2012 ; Garcin et al., 2012), lui-même dépendant de nombreux facteurs décrits dans la partie relations entre climat et isotopes (Gleixner et Mugler, 2007 ; Garcin et al., 2012 ; Kahmen et al., 2013b). Différents paramètres peuvent ensuite altérer cette relation. Afin d'obtenir des chroniques fines et précises de l'évolution des conditions climatiques, il est important de hiérarchiser ces paramètres en fonction de leur importance relative.

#### **b) Acquis et questions**

Sachse et al. (2012) ont dressé un état de l'art (résumé en Figure 15) des connaissances sur les paramètres qui influencent le  $\delta D$  moléculaire, suivant le trajet de l'hydrogène depuis l'eau de source jusqu'aux molécules archivées dans les sédiments.





**Figure 15 : Etat des connaissances liées à l'utilisation du  $\delta D$  moléculaire dans les reconstitutions paléoclimatiques (D'après Sachse et al., 2012).**

Comme on peut l'observer, certains phénomènes sont très bien compris (niveau de compréhension de 5) et ont été abondamment étudiés, alors que d'autres restent de véritables « boîtes noires » sur lesquelles les efforts sont ou doivent être fournis (niveau de compréhension de 1).

### (1) Paramètres qui contrôlent le $\delta D$ de l'eau de source

Le  $\delta D$  de l'eau source dépend en premier lieu du  $\delta D$  des précipitations, lui-même dépendant de différents facteurs comme l'altitude, la continentalité... (cf. plus haut ; Dansgaard, 1964 ; Gleixner et Mugler, 2007). Ensuite, le  $\delta D$  de l'eau absorbée par les organismes dépendra de leur milieu de vie. Les organismes aquatiques (comme les algues) utiliseront directement l'eau les environnant pour synthétiser leurs molécules. Ainsi le  $\delta D$  de l'eau des molécules produites par l'organisme sera le reflet au  $\delta D$  de l'eau dans laquelle l'organisme vit (Sachse et al., 2006). Si les eaux dans lesquelles vit l'organisme (par exemple des eaux lacustres) sont en équilibre isotopique avec les précipitations, le  $\delta D$  des molécules produites par les organismes aquatiques reflètera donc celui des précipitations.

En revanche, l'eau consommée par les organismes terrestres est soumise à l'évaporation dans les sols. Une partie de cette eau pourra s'infiltrer dans le sol où elle sera disponible pour les plantes terrestres (Bariac et al., 1994b ; Boujamlaoui et al., 2005 ; Figure 16). Différents types d'eau peuvent être retrouvés dans le sol : l'eau directement infiltrée, qui n'a pas eu le temps d'être soumise à l'évaporation, et l'eau restée en niveau superficiel, qui a pu être évaporé, avec bien entendu des conséquences sur leurs compositions isotopiques (Boujamlaoui et al., 2005 ; Bariac

et al., 1994b ; Durand et al., 2007). Le réseau racinaire des plantes est développé de telle façon qu'une plante pourra prélever de l'eau à faible profondeur mais aussi à des profondeurs potentiellement plus importantes (Boujamlaoui et al., 2005). Et il semblerait que seul ce facteur puisse expliquer une variabilité du  $\delta D$  de l'eau dans les racines, le  $\delta D$  de l'eau des racines et organes non-transpirant étant égal au  $\delta D$  de l'eau pompée dans le sol (Bariac et al., 2004a ; Wang et al., 2010). C'est-à-dire qu'elles ne vont pas capter préférentiellement l'eau sans deutérium (HHO) par rapport à l'eau contenant du deutérium (DHO). L'eau absorbée par la plante aura donc le même  $\delta D$  que l'eau du sol. On considère que l'eau prélevée par les plantes est, dans la majorité des cas, l'eau se trouvant en dessous de la limite d'évaporation, et donc une eau à l'équilibre avec l'eau météorique pour les valeurs isotopiques de l'eau (Durand et al., 2007). En suivant le trajet de cette molécule d'eau, on va suivre le réseau racinaire pour arriver au niveau du collet, c'est-à-dire le point de jonction entre les racines et la tige.

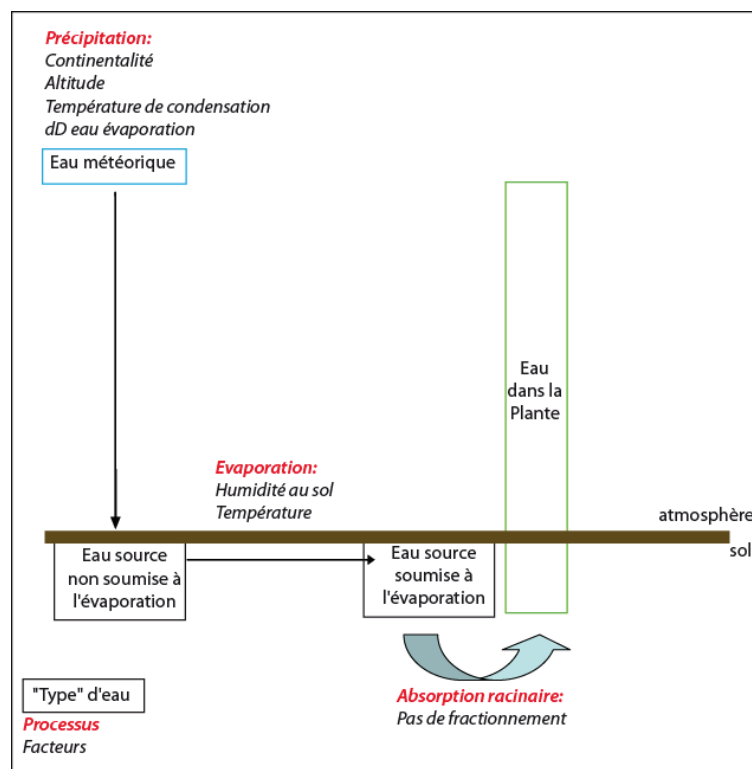


Figure 16 : Fractionnement isotopique de l'hydrogène de l'eau source.

## (2) Paramètres qui contrôlent le $\delta D$ de l'eau des feuilles

La molécule d'eau, une fois dans la tige, sera dans un milieu clos. Certaines plantes présentent des stomates sur la tige et par conséquent peuvent transpirer, c'est-à-dire qu'une étape de fractionnement serait possible pour les isotopes de l'hydrogène de la molécule d'eau (Ellsworth and Williams, 2007; Lin and Sternberg, 1993). Le millet, plante modèle dans notre étude, ne présente pas de stomate sur sa tige. Sa tige est donc un environnement clos sans fractionnement isotopique possible. La molécule d'eau sera donc transférée à la feuille, et les valeurs de  $\delta D$  de

l'eau juste avant la feuille seront identiques aux valeurs  $\delta D$  de l'eau du sol. La feuille est l'organe dans lequel a lieu toutes les synthèses de molécules. C'est en effet dans la feuille que se déroule la réaction de photosynthèse et donc les paramètres affectant la transpiration qui conditionneront le  $\delta D$  moléculaire (Figure 17). La plupart des stomates ne sont présentes qu'au niveau foliaire et leur ouverture est dépendante du type de plante (C3 / C4 / CAM), mais aussi des conditions environnementales. Ce sont donc ces deux facteurs qui détermineront principalement les taux de transpiration (Hou et al., 2007). La feuille est donc un endroit où le  $\delta D$  de l'eau pourra changer par l'effet de la transpiration permise par les stomates. Le millet, qui est une plante en C4, est adapté aux conditions arides. Ces stomates sont plus souvent fermés, pour limiter la transpiration. Or, la synthèse de composés nécessite du  $CO_2$ , molécule provenant de l'atmosphère. Par conséquent, si les stomates sont fermés, le  $CO_2$  à l'intérieur de la feuille ne peut être renouvelé et donc l'enzyme Rubisco, qui fixe le  $CO_2$  afin de fournir le carbone nécessaire à la synthèse des composés, ne pourra plus fournir de carbone. Les plantes en C4 esquivent cet inconvénient en augmentant la pression partielle en  $CO_2$  autour de la Rubisco en libérant les composés d'une molécule à 4 atomes de carbone. Cette molécule est synthétisée par la plante à l'aide de la PEP-carboxylase qui fixe la molécule de  $CO_2$  sur le phosphénol pyruvate (PEP). Cette réaction donne l'oxaloacétate qui sera la molécule dégradée aux environs de la Rubisco pour augmenter la pression partielle en  $CO_2$ . Le nom de plante en C4 vient de la formation initiale de l'oxaloacétate (OAA), composé à 4 carbones. Ce mécanisme a pour conséquence d'enrichir en  $^{13}C$  les molécules synthétisées par ce genre de plantes. Malgré ces adaptations, les plantes en C4 doivent ouvrir leurs stomates pour capter le  $CO_2$ , et sont donc également soumises à la transpiration.

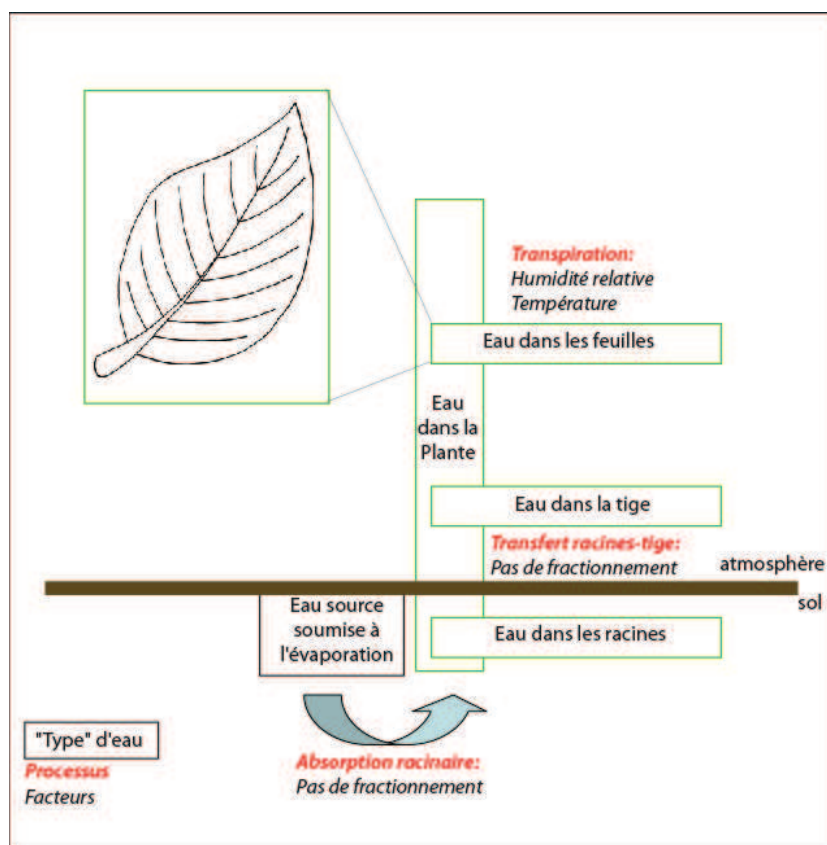
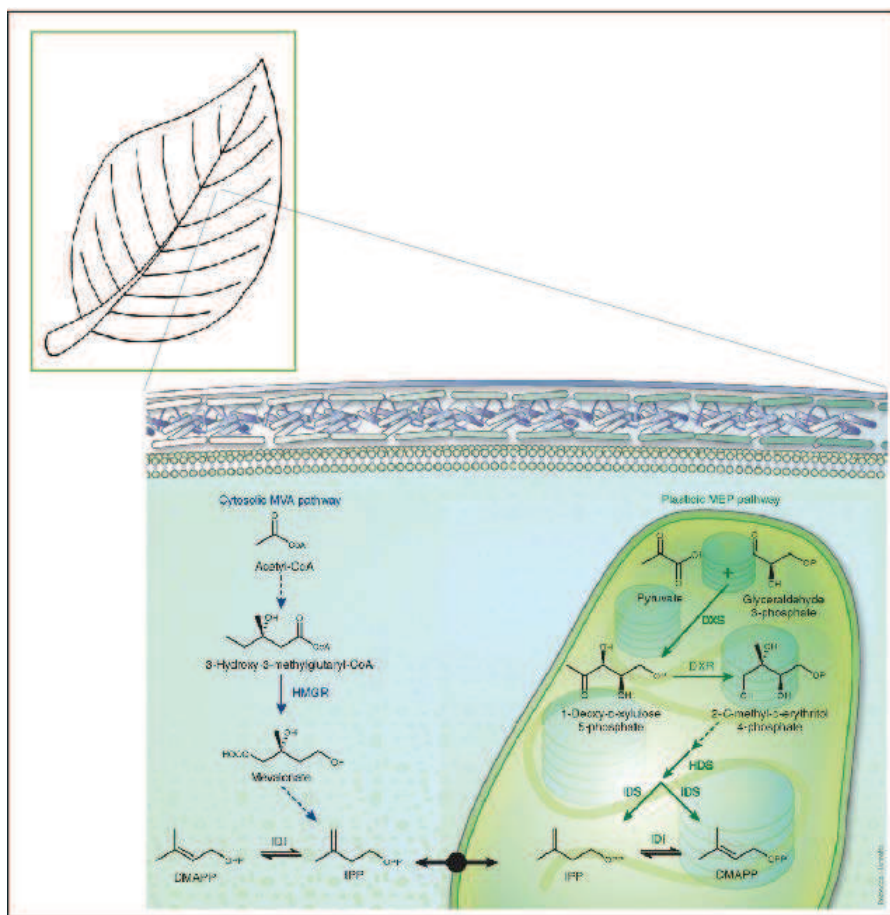


Figure 17 : Fractionnement isotopique de l'hydrogène de l'eau de la plante.

La transpiration, comme l'évaporation, aura pour conséquence un enrichissement en D de l'eau par l'évaporation préférentielle de HHO par rapport à HDO (Boujamlaoui et al., 2005 ; Bariac et al., 1994a,b ; Hou et al., 2007).

Les facteurs (la température, l'humidité relative, la physiologie de la feuille, le métabolisme -C4 / C3 /CAM) susceptibles d'influencer la transpiration sont relativement bien contraints (Figure 17). Cependant, d'autres facteurs peuvent influencer le  $\delta D$  de l'eau des feuilles des plantes supérieures. Il s'agit en particulier de l'intensité lumineuse (qui n'aurait a priori que peu d'impact) et du pool de NADPH utilisé. Nous décrirons ce dernier point plus avant dans la partie suivante.

### (3) Paramètres qui contrôlent le fractionnement biosynthétique



**Figure 18 : Différentes voies biosynthétiques de composés couramment utilisés comme biomarqueurs moléculaires - Modifié d'après Roberts, 2007. A gauche : MVA, mévalonate ; HMGR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase. A droite : MEP, méthylérythritol phosphate; DXS, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase; HDS, hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butényl 4-diphosphate synthase; IDS, isopentényl diphosphate:diméthylallyl diphosphate synthase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase. Les flèches en pointillés signifient qu'il y a plus d'une étape.**

Une fois l'eau arrivée dans les cellules photosynthétiques, elle va être utilisée dans les réactions enzymatiques pour produire les molécules organiques. Mais l'eau des cellules ne doit pas être considérée comme unique puisqu'il a été démontré que la composition isotopique de l'eau dans différents organites est différente de celle du cytoplasme (Sessions et al., 2006 Chikaraisi et al., 2009). Ainsi le  $\delta D$  de l'eau utilisée dans les réactions de biosynthèses de composés organiques dépendra du compartiment dans lequel ces réactions ont lieu (Chikaraisi et al., 2005). En ce qui concerne les composés isopréniques, ils proviennent de deux voies: la voie biosynthétique via le mévalonate (MVA), qui est cytoplasmique, et la voie biosynthétique via le méthylérythritolphosphate (MEP), qui est, elle chloroplastique. Il existe une troisième voie, dite acétogénique, qui permet la formation des acides gras (AG) et des *n*-alcanes. Cette voie est chloroplastique, comme la voie MEP. Les différences de localisations des voies métaboliques

impliquent l'utilisation d'eaux aux compositions isotopiques distinctes (Hou et al., 2007a,b ; Sessions, 1999 ; Chikaraishi et al., 2007). Il faut noter également qu'une même molécule, c'est en particulier le cas des composés isopréniques, peut être originaire d'une ou plusieurs voies biosynthétiques (Roberts, 2007). De même, la voie de synthèse des *n*-alcanes et des acides gras (et l'ensemble des *n*-alkyle lipides), qui se situe initialement dans le chloroplaste, se poursuivra ensuite dans le cytoplasme lorsque la molécule atteindra un nombre supérieur à 16 atomes de carbone (Grice et al., 2008 ; Zhou et al., 2010). Les voies MVA et MEP sont également imbriquées. Nombre de leurs précurseurs peuvent traverser les parois chloroplastiques et donc se trouver dans l'une comme l'autre voie. C'est en particulier le cas de l'inositol pyrophosphate (IPP) et du dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP ; Grice et al., 2008 ; Zhou et al., 2010) (Figure 18).

Tous ces travaux considèrent l'eau comme seul donneur d'hydrogène pour la biosynthèse, ce n'est qu'en partie vrai. Ainsi, de l'hydrogène (ou deutérium) utilisé pour la biosynthèse peut provenir d'un coenzyme, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), écrit NADPH (ou  $\text{NADPH}_2$  ou  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) quand il est sous la forme réduite. Seuls Chikaraishi et al. (2005) ont tenté une approche originale qui a démontré que le NADPH est très appauvri en deutérium, ce qui amène les auteurs, en comparant le  $\delta\text{D}$  des molécules ayant obtenu leur H par le NADPH, par rapport à celui de l'eau intracellulaire à suggérer une très haute sélectivité lors de l'incorporation d'hydrogène.

D'autres facteurs sont susceptibles d'influer sur le rapport isotopique de l'eau intracellulaire voire intra-organite. Par exemple, différents compartiments cellulaires ont des pH différents et, par conséquent, de pompes à proton fonctionnant différemment. Ces pompes à proton sont une voie qui peut potentiellement influencer sur le  $\delta\text{D}$  de l'eau des compartiments de par sa sélectivité vis-à-vis de l'hydrogène et du deutérium (Nakamura et Yamada, 2005 ; Paroutis et al., 2004 ; Shen et al., 2013 ; Wu et al., 2001).

#### *(4) Intégration dans le temps et dans l'espace*

Enfin, la dernière étape décrite par Sachse et al. (2012 ; Figure 15) est l'intégration dans le temps et l'espace des molécules produites par les végétations du bassin versant vers l'archive sédimentaire. Prenons le cas des *n*-alcanes, molécules génériques dans les plantes.

Les premiers biais sont liés à la dégradabilité des biomarqueurs moléculaires. Les molécules utilisées pour les reconstitutions paléoenvironnementales sont des molécules qui sont réputées subir peu de transformations au cours du temps, limitant les biais isotopiques liés à des dégradations préférentielles. Par ailleurs, les *n*-alcanes, tout comme la miliacine, et à l'inverse des alcools ou des acides, n'ont aucun atome d'hydrogène échangeable avec l'eau environnante en conditions naturelles non extrêmes (forte acidité, température élevée, ou concentration en  $\text{D}_2\text{O}$  importante).

Il s'agit aussi de comprendre comment le  $\delta D$  de l'ensemble des *n*-alcanes produits par une même plante reflète la possible hétérogénéité des  $\delta D$  de ces molécules au sein de la plante, en considérant également la dynamique temporelle de leur production. Par exemple, Hou et al. (2007) relèvent un renouvellement quotidien des cires épicuticulaires, alors que Sachse et al. (2009) indiquent un turn-over à l'échelle de la semaine.

Ensuite, il s'agit de déterminer la variabilité des valeurs de  $\delta D$  de *n*-alcanes produits par différents plants d'une même espèce dans des conditions environnementales à première vue identiques. Puis, de se poser la question d'éventuelles différences de  $\delta D$  des *n*-alcanes en fonction des espèces/formes végétales/grands groupes peuplant un même écosystème. Ainsi, Hou et al. (2007a) indiquent des gammes de variations de plus de 50‰ pour des *n*-alcanes produits par différents types de plantes se développant autour d'un étang.

De la même façon, différentes études montrent que, pour les *n*-alcanes, une variation d'humidité entraîne une synthèse accrue de ces composés dans certaines espèces et moindre dans d'autres (Hoffmann et al., 2013). Il est donc nécessaire d'évaluer si une variation du  $\delta D$  des *n*-alcanes dans une archive sédimentaire est due à un changement en  $\delta D$  de l'eau météorique ou bien à un changement de contributeurs majoritaires du fait d'une variation d'humidité. Ces questions, à l'échelle écosystémique, sont encore peu prises en considération et ne permettent donc pas encore de quantification réaliste des changements climatiques et ou hydrologiques.

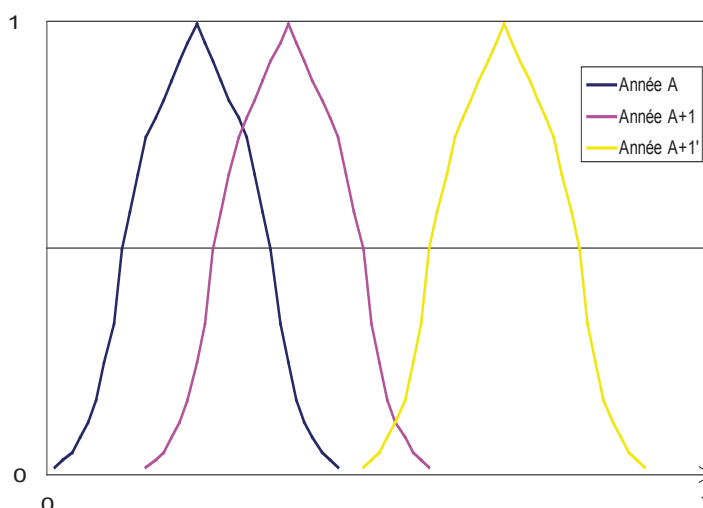
La dernière interrogation sur les modalités d'intégration dans le temps et l'espace des biomarqueurs moléculaires est celle de la représentativité de l'archive par rapport au bassin versant. Peu d'études sont menées afin de déterminer comment est enregistré le signal isotopique dans les sédiments (Hou et al, 2007a ; Hou et al, 2007b ; Schefuß et al, 2011 ; Sachse et al, 2012). Or, ces questions sont primordiales pour les reconstitutions paléoenvironnementales. En effet, une forte variabilité spatiale du  $\delta D$  peut être retrouvée selon différents gradients latitudinaux et altitudinaux (Sachse et al., 2006 ; Garcin et al., 2012, cf. supra). Ainsi, un bassin versant de taille importante pourrait collecter des molécules aux  $\delta D$  très variables du fait de conditions environnementales très variables. C'est le reproche qui peut être fait, par exemple, aux travaux de Schefuß et al. (2005) sur les sédiments au large du Congo qui drainent un bassin versant de très grande taille. La variabilité du  $\delta D$  observé dans l'archive ne pourrait-il alors pas être dû à un changement de contribution d'une des zones du bassin versant ?

Outre la question de la représentativité de l'archive par rapport à l'hétérogénéité du bassin versant qu'elle draine, se pose la question de la représentativité de la carotte prélevée et de ses échantillons constitutifs par rapport à l'archive dans sa globalité (le signal obtenu sur une carotte sédimentaire reflète-t-il le signal sédimentaire de l'ensemble de l'archive ?). Se pose également la question d'éventuels décalages temporels entre le temps de production des molécules et le temps d'archivage. Li et al. (2011) indiquent par exemple que l'épisode médiéval sec qu'a connu la côte



ouest des Etats Unis n'a été enregistré dans les sédiments du bassin de Santa Barbara que près de 200 ans plus tard. Il est question ici des stockages temporaires des molécules durant leur trajet du lieu de production vers l'archive, à travers par exemple les sols, ou les sédiments de rivière, ou encore de vitesse de transport différente entre différents marqueurs.

Cette question est illustrée en Figure 19. Si les molécules produites durant l'année A+1 sont mélangées à celles produites durant l'année A dans les sols (du fait d'un transfert incomplet de ces dernières durant l'année A) et que l'ensemble est drainé vers l'archive, alors le sédiment correspondant à l'année A+1 enregistrera un signal mixte des années A et A+1 pondéré des proportions des molécules produites durant les deux années. Par contre, si les molécules produites pendant l'année A+1 sont bien séparées de l'année A, (cf cas A+1') alors on peut considérer distincts les signaux des deux années. Cette volonté de trouver un signal d'enregistrement court est très présent dans les publications (Sachse et al., 2006, 2010, 2012 ; Sessions et al., 2006), car il pourrait permettre de retracer les conditions hydrologiques d'un court moment réduisant ainsi les risque de dilution interannuelle du signal.



**Figure 19 : Archivage d'une molécule au cours du temps et dilution du signal précédent par le signal de l'année suivante.**

Toutes ces considérations sur l'intégration spatiale et temporelle des biomarqueurs moléculaires et de leur composition isotopique supposent que le stock initial produit par la plante est intégralement archivé dans le sédiment. Or, ces molécules peuvent subir différentes dégradations dès qu'elles intègrent les systèmes géologiques, lors de la diagenèse. Par exemple, on sait que de nombreuses bactéries peuvent dégrader les *n*-alcane contenus dans le pétrole (Kato et al., 2001 ; Massias et al., 2003 ; Zhang et al., 2011). Ces bactéries se retrouvent en milieu naturel, d'où leur intérêt pour la décontamination des sites et sols pollués (Ostberg et al., 2006 ; Yousaf et al., 2010). Deux opportunités s'offrent alors pour les reconstitutions paléoenvironnementales :



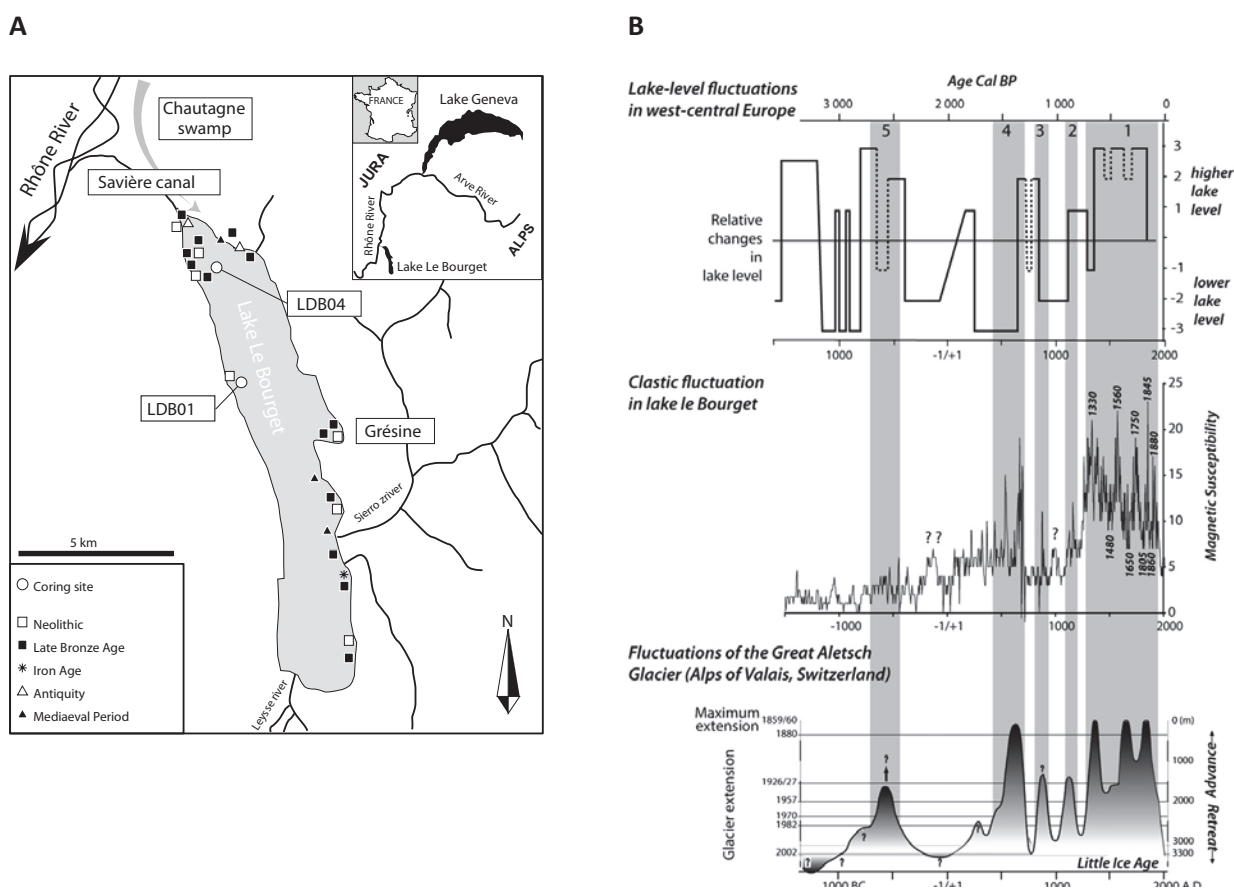
1°/ il reste du matériel et on considère que la partie qui a été dégradée n'est qu'une infime portion du matériel restant dans l'archive et/ou que la partie dégradée n'était pas préférentiellement enrichie et/ou appauvrie en isotopes. Dans ce cas, on peut considérer que la dégradation n'impacte que très peu les valeurs isotopiques mesurées.

2°/ la dégradation affecte préférentiellement des molécules enrichies ou appauvries en isotopes lourds ce qui interdirait toute utilisation future des rapports isotopiques de ces composés dégradés comme proxy paléoclimatique, sans correction préalable que ce soit une dégradation due à une maturation des sédiments (Radke et al., 2005) ou par une dégradation microbienne (Zech et al., 2009, 2011).

Chikaraishi et Narakoa (2006) ont montré que des différences pouvaient être observées entre le  $\delta D$  des *n*-alcanes des feuilles et celui des *n*-alcanes du sol, suggérant que la dégradation préférentielle pouvait conduire à des différences de composition isotopique. Nguyen Tu et al. (2011) proposent eux que les *n*-alcanes de la litière pourraient provenir d'une contribution en *n*-alcanes de micro-organismes puisque, malgré la diminution des concentrations entre plante et sol, aucun effet n'est observable sur les valeurs de  $\delta^{13}C$  des *n*-alcanes, si ce n'est celui d'un apport de composés par les micro-organismes. Zech et al. (2011) ont eux montré la même chose pour les isotopes de l'hydrogène des *n*-alcanes.

#### **4. Le projet PalHydroMil**

Ma thèse s'inscrit dans la logique des projets Aphrodyte (ECLIPSE, CNRS) puis Pygmalion (ANR) qui avaient pour objectif de retracer l'évolution hydrologique durant l'Holocène dans les Alpes et d'estimer dans quelle mesure la variabilité hydrologique avait pu affecter le développement des sociétés humaines et les flux érosifs. Entre autres résultats, ces projets ont permis de dresser une chronologie fine des flux détritiques provenant des crues du Rhône et archivés dans les sédiments du lac du Bourget (Figure 20A) pour les 10 derniers milliers d'années (Arnaud, 2003 ; Arnaud et al., 2005 ; Debret et al., 2010; Figure 20B).



**Figure 20 : A : Localisation du Lac du Bourget, des principaux sites archéologiques qui ont été identifiés sur ses rives, du trajet des flux détritiques provenant du Rhône en période de crue et des sites de carottage sédimentaire (LDB01 et LDB04 ; extrait de Jacob et al., 2008a). B : Evolution de la susceptibilité magnétique (indicateur de détritisme) dans la carotte LDB04 durant l'Holocène et relations avec d'autres enregistrements paléohydrologiques acquis dans les Alpes et le Jura (Debret et al., 2010).**

Ces travaux montrent des phases d'intense détritisme (périodes correspondant aux zones grisées) interprétées comme des épisodes de crues résultant de fortes précipitations à l'échelle des Alpes. Ces épisodes sont cohérents avec l'évolution des niveaux des lacs dans les Alpes et le Jura (Magny, 2004), ou les avancées des glaciers (Holzhauser et al., 2005).

L'ISTO a réalisé l'analyse moléculaire de deux carottes de sédiments (LDB01 et LDB04). Dans ces sédiments, Jacob et al. (2008a, b ; Figure 21) ont détecté la présence de miliacine (oléan-18-en-3 $\beta$ -ol méthyle éther ; Figure 22), un triterpène pentacyclique qui porte une fonction méthyle éther en position 3, ou PTME pour Pentacyclic Triterpene Methyl Ether. Cette molécule avait déjà été détectée dans des sédiments d'un lac brésilien, associée à d'autres éthers méthyliques de triterpènes pentacycliques (Jacob et al., 2005) dont les sources végétales sont pour la plupart des graminées comme l'attestent les travaux des phytochimistes (voir Ohmoto et

al., 1970 par exemple). Dans le cas du Lac du Bourget, la miliacine est le seul PTME détecté, ce qui a conduit les auteurs à considérer que la source de miliacine dans les sédiments ne pouvait provenir que d'une plante synthétisant la miliacine, à l'exclusion de tout PTME. La comparaison des producteurs exclusifs de miliacine recensés dans la littérature avec les plantes identifiées lors de l'analyse carpologique du site de Grésine, situé sur les bords du Lac du Bourget (Bouby et Billaud, 2001) permet d'identifier le millet commun (*Panicum miliaceum*) comme source la plus probable de la miliacine des sédiments. Ces résultats sont confirmés par la mesure du  $\delta^{13}\text{C}$  de la miliacine qui indique que cette molécule a été produite par une plante avec un métabolisme en C4 (Jacob et al., 2009a), tel que le millet commun, une plante introduite (aucune plante en C4 ne peuplait de manière naturelle les Alpes à cette période).

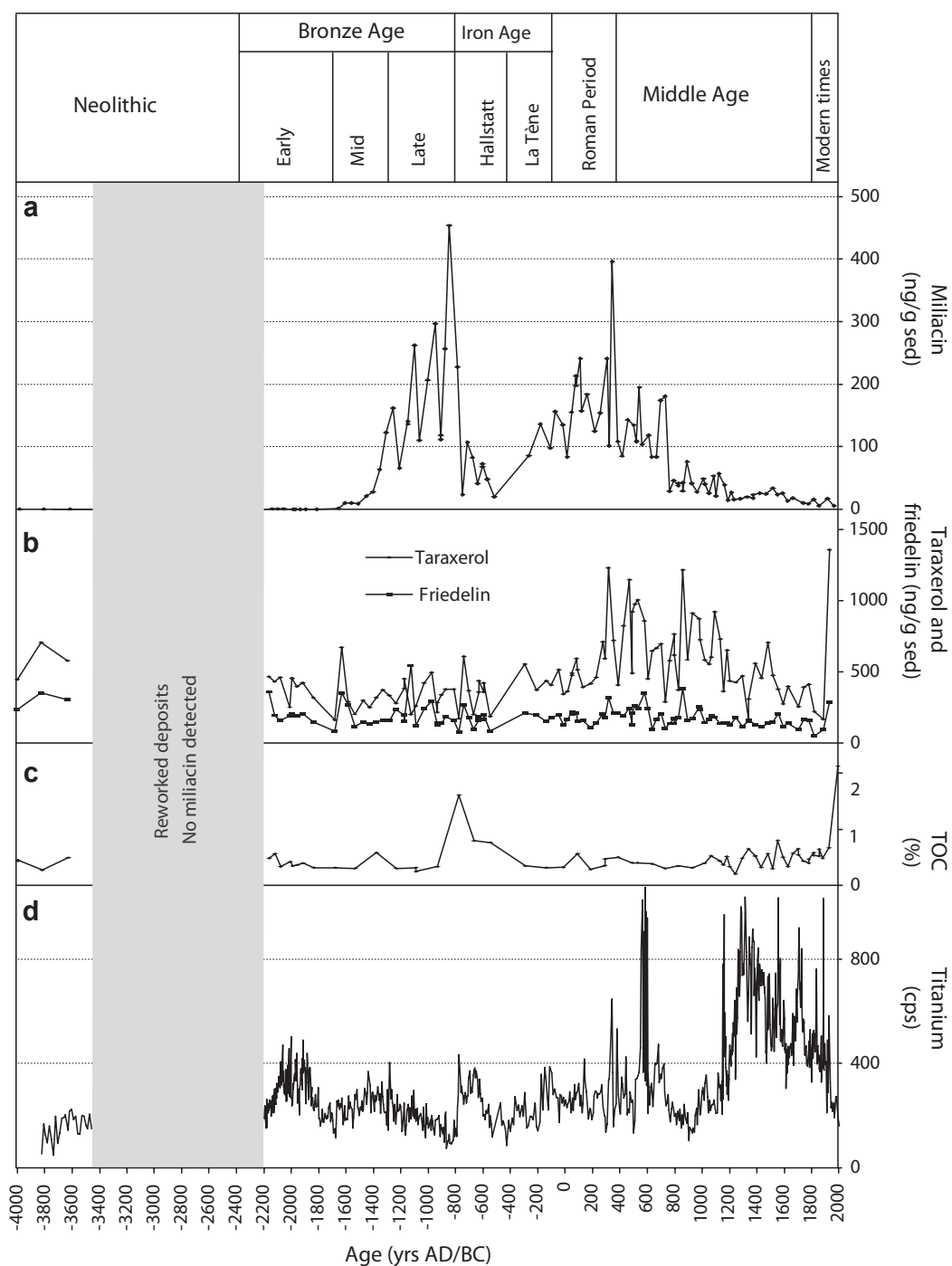


Figure 21 : Evolution des concentrations en miliacine dans les sédiments du lac du Bourget (Extrait de Jacob et al., 2008).

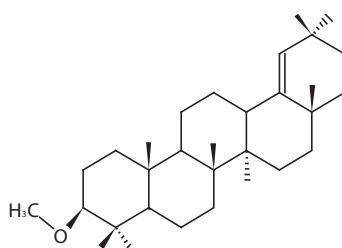


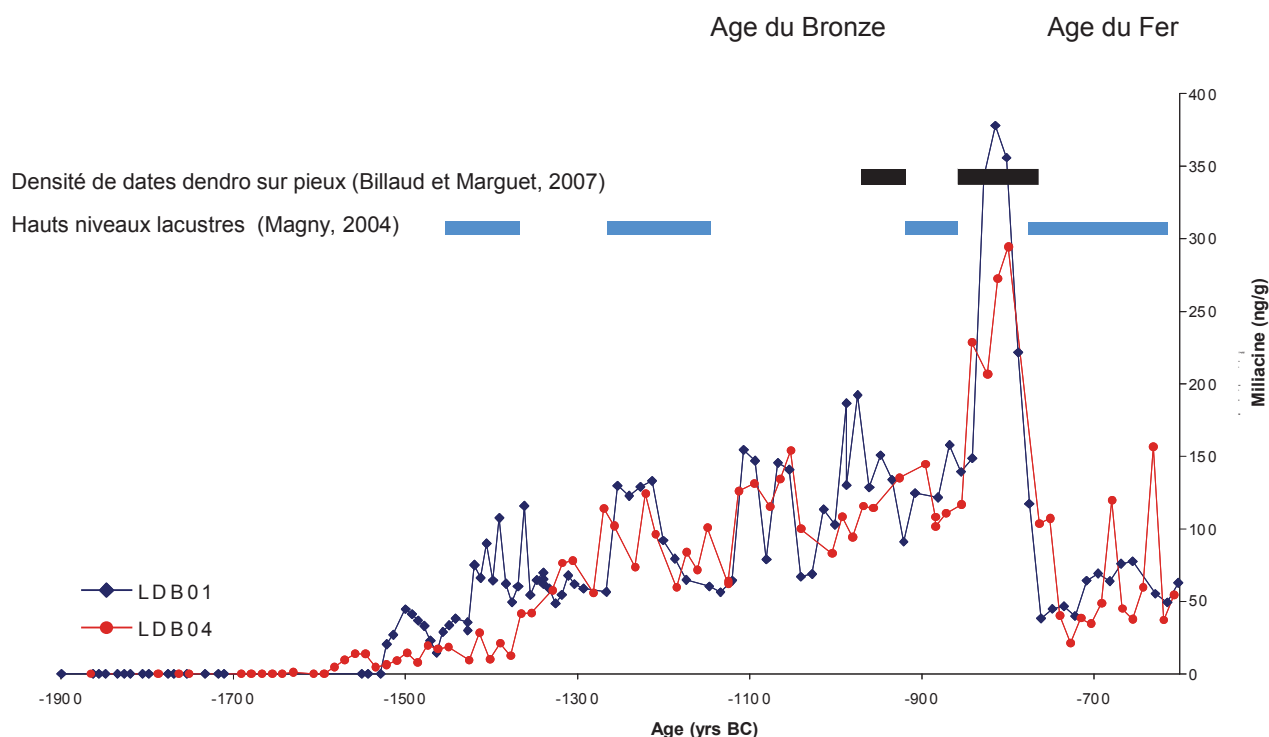
Figure 22 : Structure de la miliacine (oléan-18-en-3 $\beta$ -ol méthyle éther).

La quantification de la miliacine à basse résolution dans la carotte LDB01 a permis les conclusions suivantes : (1) les concentrations en miliacine ne dépendent pas du taux de sédimentation, du détritisme ou de la teneur en matière organique ; (2) la miliacine est détectée dans les sédiments datés d'environ 1700 av. J.C., ce qui correspond à la date supposée d'introduction du millet commun dans la région (Marinval, 1995). Jacob et al. (2009b) ont par ailleurs montré que l'arrivée de cette nouvelle céréale dans la région s'était accompagnée de nouvelles pratiques culturales qui ont significativement impacté l'érodabilité des sols ; (3) La chute drastique des concentrations en miliacine à la transition entre l'âge du Bronze et l'âge du Fer (datée à 800 av. J.C.) coïncide avec une péjoration climatique majeure qui se traduit par une augmentation généralisée des niveaux lacustres dans les Alpes et le Jura (Magny, 2004) et l'abandon des cités lacustres de l'âge du Bronze (dernier pieu daté par dendrochronologie à 806 av. J.C.). La conclusion déduite par Jacob et al. (2008) est que la culture du millet a cessé en 800 B.C. du fait de l'abandon des rives par les populations sous la contrainte d'un changement climatique majeur.

Depuis ces résultats préliminaires, des analyses à plus haute résolution, et dans les deux carottes (LDB01 et LDB04) ont été réalisées dans le but de préciser l'évolution des concentrations en miliacine dans les sédiments datés de l'âge du Bronze. De manière surprenante, l'évolution des concentrations en miliacine est remarquablement semblable dans les deux carottes pourtant distantes de 4 km (Figure 23 ; J. Jacob, résultats non publiés), ce qui indique que l'enregistrement vaut à l'échelle du bassin de sédimentation.

Entre 1700 et 800 av. J.C. les concentrations en miliacine fluctuent de manière quasi-périodique et montrent un maximum de concentration entre 900 et 800 av. J.C. Pour expliquer ces variations, les auteurs favorisent des changements dans la quantité de millet cultivé autour du lac du Bourget plutôt que des variations dans le transport depuis son lieu de culture vers le sédiment ou des problèmes de conservation. L'hypothèse actuellement en cours (Jacob, non publié) est que les variations de concentration en millet traduisent des phases d'emprise et de déprise agricole résultant de variations démographiques. Cette hypothèse est appuyée par la comparaison avec la densité des dates dendrochronologiques mesurées sur pieux et avec les données démographiques issues de l'analyse des surfaces des sites archéologiques qui montrent, par exemple, un maximum de population autour du lac sur la période 900-800 av. J.C (Figure 23 et Billaud, non publié).

La raison de ces variations démographiques n'est pas élucidée mais la nature quasi-périodique de l'évolution des concentrations en miliacine associée à des coïncidences avec l'évolution des niveaux lacustres sur cette période (malheureusement à moindre résolution temporelle) suggère un contrôle climatique partiel (Figure 23).



**Figure 23 : Evolution des concentrations en miliacine durant l'âge du Bronze dans les carottes LDB01 et LDB04 et correspondance avec la densité de dates mesurées sur des pieux archéologiques et l'évolution des niveaux lacustres (Jacob, non publié).**

A l'heure actuelle aucun enregistrement ne permet de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'un contrôle climatique sur l'évolution démographique, ou du moins sur l'évolution des concentrations en miliacine.

Le projet PalHydroMil repose sur la présence d'une molécule provenant uniquement d'une plante, à savoir la miliacine, comme biomarqueur du millet commun *Panicum miliaceum* (Jacob et al., 2008). Ce cas rare d'association d'un biomarqueur à une seule espèce de plante ouvre de nouvelles perspectives, comme l'établissement d'une quantification des changements hydrologiques ayant eu lieu à l'âge du Bronze à partir du  $\delta D$  de ce biomarqueur.

Le projet PalHydroMil se divise en quatre phases :

1 – Calibration : la culture de *P. miliaceum* en milieu contrôlé, permettant de relier le  $\delta D$  de la miliacine avec des paramètres climatiques.

2 – Persistance : l'incubation de miliacine d'un  $\delta D$  connu dans différentes conditions dégradantes permettra de connaître la robustesse du signal  $\delta D$  miliacine.

3 – Validation : par comparaison du  $\delta D$  de la miliacine extraite de sédiments récents avec les données instrumentales.

4 - Application : la miliacine a été quantifiée dans deux séries sédimentaires lacustres à haute résolution. On espère ainsi pouvoir utiliser le  $\delta D$  de la miliacine comme nouveau proxy permettant de reconstituer des variations des paramètres hydrologiques au cours du temps, et de les quantifier.

Ma thèse a concerné principalement le point 1 et devait également prendre en charge le point 4. Du fait de quantités trop faibles de miliacine dans les sédiments du Lac du Bourget, je n'ai pu obtenir de résultats satisfaisants sur l'évolution du  $\delta D$  de la miliacine au cours de l'âge du Bronze. J'ai donc essentiellement porté mon attention sur les aspects pertinence et calibration (cf. infra).

Mon travail a également consisté en des développements méthodologiques qui sont décrits dans le **Chapitre II (Méthodes)**. L'extraction de la miliacine (du sol ou des graines), sera tout d'abord détaillée. S'ensuivra la description des biais pouvant être induits par la séparation de la miliacine. Enfin l'utilisation et le développement des méthodes exploitées pour la mesure du  $\delta D$  (et du  $\delta^{13}C$ ) seront présentés avec, entre autres, des éléments fournis lors de la formation chez ThermoFischer financée par le projet PalHydroMil.

Mon attention s'est donc ensuite surtout portée sur la pertinence de ce nouveau proxy, selon différents aspects qui constituent le **Chapitre III (Pertinence)**. (1) la miliacine est-elle un marqueur univoque du millet commun *P. miliaceum* ? La miliacine a en effet été détectée par certains auteurs dans des espèces potentiellement présentes sur le bassin versant du lac du Bourget à l'époque qui nous intéresse. (2) le  $\delta D$  miliacine est-il spatialement pertinent/homogène ? (3) Quelle est la variabilité temporelle du  $\delta D$  miliacine en relation avec la variabilité temporelle du  $\delta D$  des eaux météoriques. (4) Comment est réalisée la transmission du  $\delta D$  miliacine des plantes vers le sol ? (5) L'archivage du  $\delta D$  miliacine dans différents sédiments enregistrant les mêmes phénomènes est-il cohérent pour une même période ?

Après cette phase de vérification de la pertinence de l'utilisation de ce proxy, j'ai voulu comprendre les principaux paramètres pouvant affecter le  $\delta D$  de la miliacine par une étude de calibration (**Chapitre IV, Calibration**). Cette phase de calibration correspond à deux phases de culture du millet commun *P. miliaceum* que nous avons réalisées dans le laboratoire BIOEMCO dans 3 conditions hydrologiques différentes, avec des gradients de 3 paramètres : (1) le  $\delta D$  de l'eau source, ou solution hydroponique dans notre cas ; (2) deux humidités relatives de 61 et 74% ; (3) le stress hydrique aux racines, avec un gradient de Polyéthylèneglycol permettant des stress de 0 à -10bars.

Une fois cette partie close, je rappellerai les résultats majeurs de cette thèse dans une **Conclusion** et achèverai ce manuscrit par les **Perspectives** que laissent entrevoir ces travaux.





## CHAPITRE II – METHODES

Comme cela a été repris dans la partie précédente, les changements environnementaux affectant l'Holocène sont, certes, significatifs, mais toutefois bien inférieurs en amplitude à ceux subis par la Terre au cours des temps géologiques antérieurs. Aussi, certains changements hydrologiques pourraient se signaler par des variations isotopiques de très faible amplitude. Il est donc nécessaire d'accorder une extrême rigueur afin de limiter les fractionnements isotopiques qui pourraient survenir durant les étapes en amont de la mesure des compositions isotopiques, qu'il s'agisse des mesures sur l'eau ou de la mesure du  $\delta D$  sur molécules individuelles. Ces étapes incluent les cultures en conditions contrôlées ou les prélèvements en milieu naturel en fonction de l'origine des échantillons, la chaîne de traitement que subissent ces échantillons (extraction, séparations éventuelles, mesures...) mais aussi l'optimisation des méthodes d'analyse. La plupart des matériels et appareils utilisés dans le cadre de ce travail sont décrits dans les parties suivantes. Je n'évoquerai ici que quelques points sur lesquels je me suis focalisé lors de mon travail.

### **A. Fractionnement isotopique possible lors des différentes étapes de la vie de l'échantillon**

#### **1. Prélèvements**

En Sciences Naturelles, la qualité d'échantillonnage conditionne la qualité des résultats et des interprétations qui pourront en être obtenues. La miliacine que nous avons étudiée est une molécule dans laquelle tous les hydrogènes sont liés de manière covalente à des atomes de carbone. Ces atomes d'hydrogène sont donc réputés non-échangeables dans les conditions naturelles régnant à la surface de la Terre. Il est donc raisonnable de penser que la qualité du prélèvement n'affectera pas le  $\delta D$  miliacine. En revanche, nous avons été particulièrement attentifs lors du prélèvement des matériels sur lesquels nous avons analysé la composition isotopique de l'eau (matériel végétal et sol). En effet, la composition isotopique de l'eau est extrêmement sensible aux fractionnements isotopiques pouvant survenir lors de l'évaporation de l'eau. Aussi, lors de la collecte des échantillons de sol ou d'eau, nous avons immédiatement abrité les échantillons dans des flacons hermétiques puis les avons congelés. La distillation de ces eaux est décrite dans le Chapitre IV.

#### **2. Fractionnements associés à l'extraction des lipides**

L'extraction des sédiments du Lac du Bourget a été réalisée, après broyage, soit par un mélange DCM:MeOH 9:1 sous ultrasons, soit via ce même mélange par extraction automatique à 100° et sous pression au moyen d'un ASE (Accelerator Solvent Extractor, DIONEX ; Jacob et al., 2009). En revanche, l'extraction des graines a été réalisée, après broyage, par extraction manuelle avec du DCM:Isopropanol 2:1. Nous avons voulu vérifier que ces différences de procédés

d'extraction n'induisaient pas, l'un par rapport à l'autre, une extraction préférentielle d'une miliacine plus enrichie ou plus appauvrie en deutérium.

Pour ce faire, j'ai broyé finement 6 lots de 50 graines de millet. 3 lots ont été extraits manuellement avec la procédure standard qui implique un mélange DCM:Isopropanol 2:1 d'un volume équivalent à celui de la farine obtenue. Les 3 autres lots ont été extraits à l'ASE selon la même méthode que pour les sédiments, avec toutefois ajout de sable de Fontainebleau pour remplir les cellules d'extraction de l'ASE.

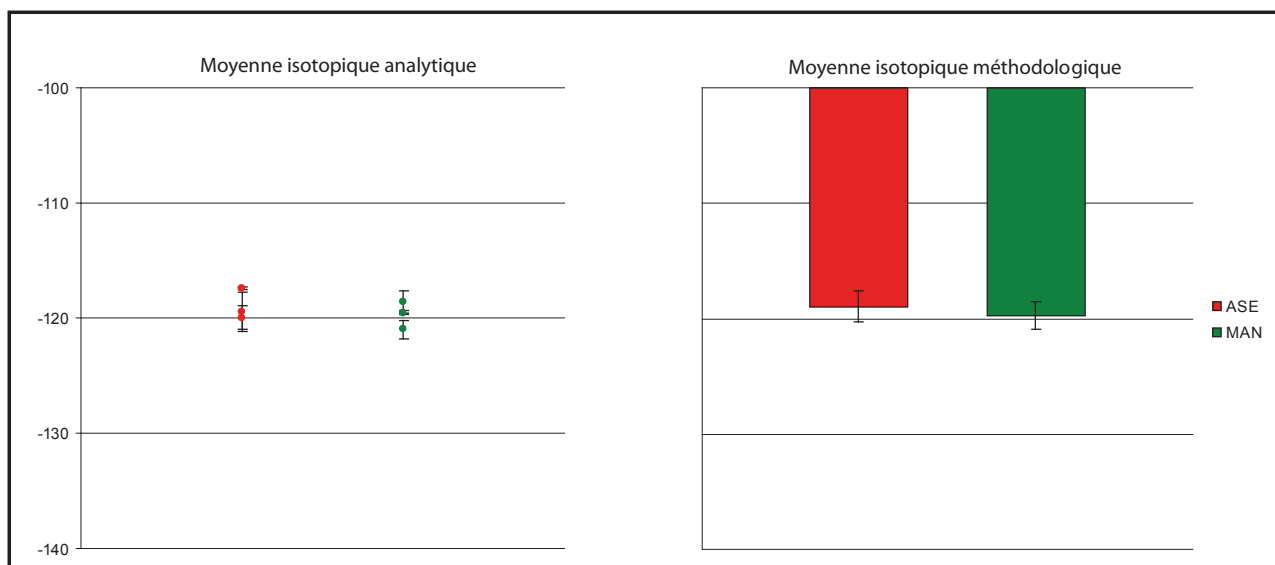


Figure 24 :  $\delta D$  miliacine de graines de millet d'un même lot extrait à l'ASE et manuellement.

### 3. Fractionnements associés à la purification / séparation des lipides

Une fois l'extraction réalisée, l'extrait est séché sous azote (s'il a été extrait à l'ASE). Il s'agit ensuite de fractionner cet extrait total afin d'obtenir des fractions relativement "propres" en chromatographie, ce qui évite la coélution d'autres molécules avec la miliacine, source d'erreurs analytiques. Les séparations utilisées au laboratoire pour le traitement des lipides sont de deux types. Dans un premier temps, il s'agit de séparer l'extrait total en composés dits "neutres" des composés acides et polaires par extraction en phase solide sur de la silice greffée de groupements aminopropyle qui ont la propriété de fixer les composés acides. Après reprise dans du DCM:Isopropanol 2:1, l'extrait total est déposé en tête de colonne, les composés neutres (parmi lesquels la miliacine) sont élués avec un volume complémentaire de DCM:Isopropanol 2:1. Après acidification du milieu grâce à un mélange éther:acide formique 9:1 qui permet de décrocher les acides de la phase stationnaire, les composés acides sont élués avec de l'éther. Les composés les plus polaires sont finalement élués avec du méthanol.

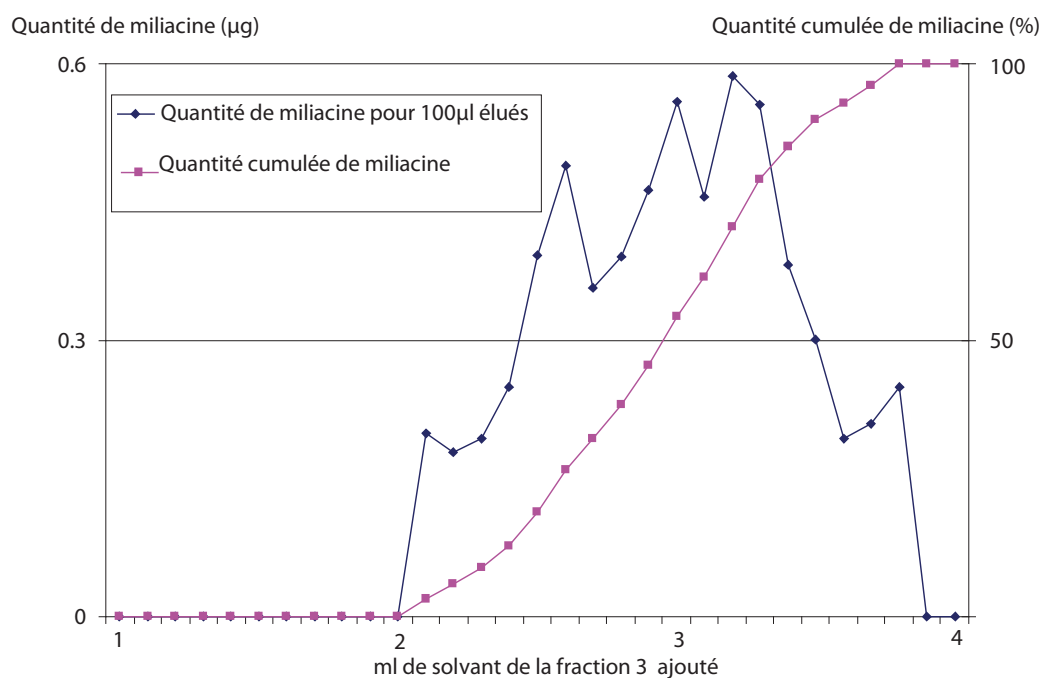
La miliacine éluée donc dans la fraction "neutres" qui comprend également des alcanes, des composés aromatiques, des stérols, triterpénols, cétones... Afin d'éviter d'éventuelles coélution lors de la séparation par chromatographie en phase gazeuse (cf. infra), il est nécessaire de

fractionner à nouveau la fraction "neutres". Cette séparation par chromatographie d'affinité est réalisée sur de la silice pure activée (24h à 100°) puis désactivée avec 5 % volume d'eau distillée. L'utilisation de solvants et mélanges de solvants de polarité croissante permettra d'obtenir 8 fractions telles qu'indiquées dans le Tableau 2. La miliacine éluera avec la fraction contenant les éthers.

**Tableau 2 : Méthode de séparation de la fraction des neutres totaux.**

Fraction	Famille de molécules récupérées	Eluant	Quantité
Fraction 1	hydrocarbures aliphatiques et cycliques	Heptane	0,5ml de dépose +2ml
Fraction 2	hydrocarbures aromatiques	Heptane-toluène (3:1)	1ml d'heptane puis +2ml
Fraction 3	esters et éthers	Heptane-toluène (1:1)	2,5ml
Fraction 4	cétones,	Heptane acétate d'éthyl (95%)	2ml
Fraction 5	alcools	Heptane acétate d'éthyl (90%)	2ml
Fraction 6	stérois et triterpénols	Heptane acétate d'éthyl (85%)	2ml
Fraction 7	stérois et triterpénols	Heptane acétate d'éthyl (80%)	2ml
Fraction 8	polaires	Méthanol	3ml

Le deuxième facteur qui peut altérer les valeurs  $\delta D$  de la miliacine est l'élution de la molécule d'intérêt dans différentes fractions lors de ces séparations. Or, il s'avère que lors d'une chromatographie, un fractionnement isotopique peut survenir si la séparation est incomplète (une molécule se distribuant dans deux fractions distinctes), suivant le principe qui sera décrit dans la partie suivante (chromatographie gazeuse). C'est pourquoi il faut vérifier que la molécule d'intérêt n'a élué que dans une fraction, et le cas échéant, regrouper les fractions. Nous avons ainsi vérifié la proportion de miliacine éluee au fur et à mesure d'une élution par un mélange heptane:toluène 1 :1. Comme indiqué sur la Figure 25, la miliacine n'était pas totalement éluee avec les 2.5ml suggérés dans la méthode utilisée au laboratoire. La totalité de la miliacine était obtenu pour 4ml alors que les 90% étaient atteints pour 3.7ml d'heptane:toluène 1:1 ; Figure 25.



**Figure 25 : Quantité de miliacine éluee en fonction de la quantité de solvant ajouté.**

Nous corrigeâmes ce biais en réduisant la hauteur de silice dans les colonnes ce qui permit l'élution de la totalité de miliacine dans les 2.5ml. Les fractions 4 et 5 (contenant les cétones) et 6 et 7 (contenant les alcools) ont été regroupées. Une fois la miliacine purifiée dans une seule et unique fraction, elle est quantifiée par GC-MS (après ajout de  $5\alpha$ -cholestane comme standard interne) puis sa composition isotopique en hydrogène est déterminée par GC-irMS.

Avant de détailler le développement de la méthodologie pour la mesure du  $\delta D$  miliacine, nous allons détailler la GC-irMS et les tests couramment effectués afin de vérifier la robustesse des analyses  $\delta D$ .

## B. Détermination des rapports isotopiques sur molécules individuelles

### 1. Fidélité, justesse et exactitude

Toute utilisation d'un appareil nécessite de connaître 3 de ses caractéristiques (Figure 26):

- la **fidélité**, c'est-à-dire la répétabilité d'un résultat, même dans l'erreur,
- la **justesse**, qui est la capacité à avoir une moyenne donnant le bon résultat, mais avec un écart entre les résultats importants,
- et enfin l'**exactitude**, qui correspond à la fidélité et à la justesse en même temps.

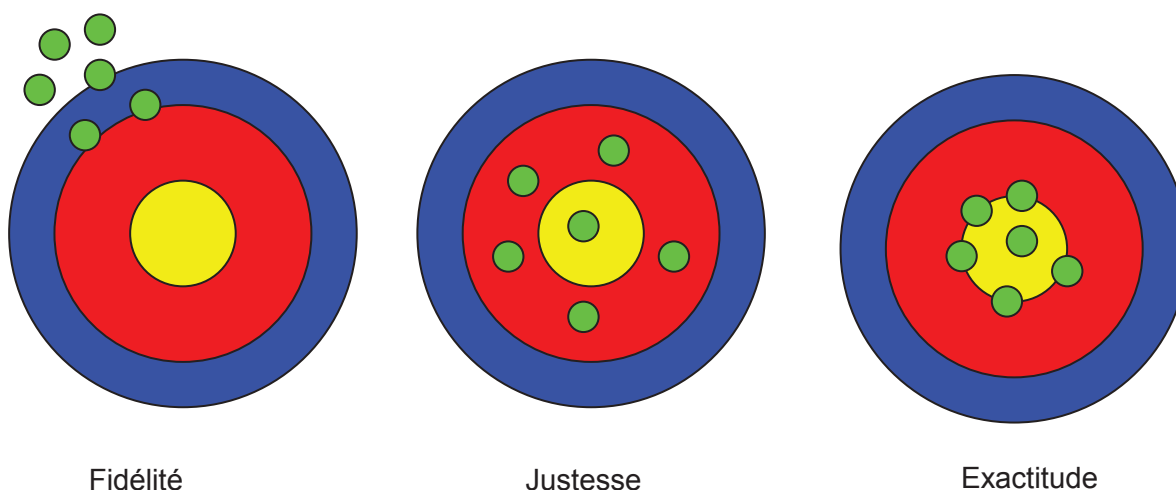
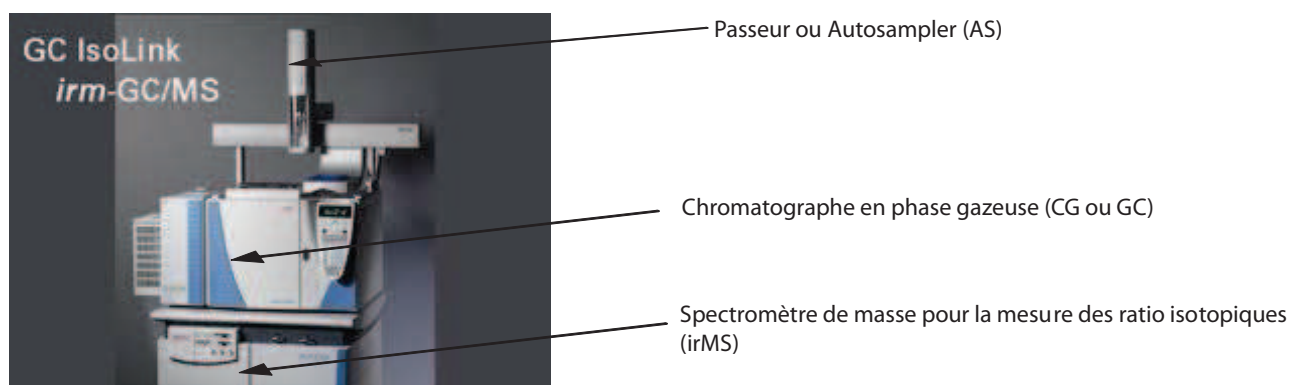


Figure 26 : Définition des paramètres Fidélité, Justesse et Exactitude.

### 2. Description de la GC-irMS

La GC-irMS (Figure 27) est un couplage entre un chromatographe en phase gazeuse (CPG ou GC) et un spectromètre de masse pour mesurer les rapports isotopiques (irMS). Dans notre cas, un passeur automatique est disposé en amont de la GC afin d'assurer la reproductibilité des injections et de fonctionner en toute autonomie. Ensuite, un chromatographe en phase gazeuse permet la séparation des composés organiques en fonction de leur masse et de leur polarité. En fin de colonne chromatographique, les molécules sont thermiquement converties en gaz. Un diluteur permet d'adapter la quantité de gaz de référence à la quantité de gaz produit par l'échantillon. Enfin, le spectromètre de masse isotopique détermine les rapports de masse des gaz issus de l'échantillon ou de la référence.



**Figure 27 : Photographie d'une GC-irm-MS (source ThermoFisher).**

Le détail du cheminement des composés est détaillé Figure 28. Le passeur prélève de 1 à 3  $\mu\text{l}$  de l'échantillon dilué dans un solvant. Le volume d'injection dépend de la concentration de l'échantillon, de la quantité de solvant, du volume de la chambre d'injection et de la température de la chambre d'injection. Lorsque l'on coinjecte un standard avec un échantillon, il n'est possible de prendre qu'1  $\mu\text{l}$  de standard, 1  $\mu\text{l}$  d'air et 1  $\mu\text{l}$  de l'échantillon. Les 3  $\mu\text{l}$  sont la capacité maximale de la chambre d'injection que nous utilisons. La température de cette chambre est fixée à 280°C. Une fois injectées, les molécules qui constituent l'échantillon (+ le solvant d'injection) condensent en tête de colonne chromatographique. Elles seront ensuite séparées dans la colonne chromatographique en fonction de leur volatilité qui est conditionnée par leur masse et leur affinité pour la phase stationnaire (silice gréée le plus souvent), qui est dépendante de leur polarité. Au fur et à mesure de la montée en température du four de chromatographie, les molécules vont séquentiellement se volatiliser et être charriées par de l'hélium, gaz vecteur (ou phase mobile).

En sortie de colonne chromatographique, chaque molécule (si la séparation est optimale) sera convertie de manière complète (sans fractionnement isotopique, donc) en un gaz. Pour la mesure des isotopes de l'hydrogène, les composés sont convertis en  $\text{H}_2$  dans un four de pyrolyse. Pour la mesure des isotopes du carbone, les molécules sont converties en  $\text{CO}_2$  dans un four d'oxydation ou de combustion. Le gaz ainsi produit est transmis au spectromètre de masse sous flux d'hélium.

Les gaz sont envoyés dans la source (détaillée en Figures 29 et 30) ionisés puis le faisceau d'ions sera dévié par un champ magnétique, en fonction de la masse des gaz  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ . Différentes coupelles récoltent les ions déviés. Deux pour l'hydrogène, collectant les masses 2 et 3 de la molécule de dihydrogène ( $\text{HH}$  et  $\text{DH}$ ). En mode carbone, il y a trois coupelles collectant les masses 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ) et 46 ( $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ).

Les résultats des analyses sont exploités dans le logiciel ISODAT, sous forme de chromatogrammes d'abondances des masses 2 et 3 ou 44, 45 et 46. Le logiciel pilote les séquences d'analyse et le paramétrage des appareils ainsi que le retraitement des fichiers. En particulier, le logiciel normalise les valeurs de  $\delta\text{D}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  sur l'échelle V-SMOW ou V-PDB

grâce au gaz de référence dont les valeurs ont été calibrées par les standards dont les valeurs ont été déterminées par ailleurs.

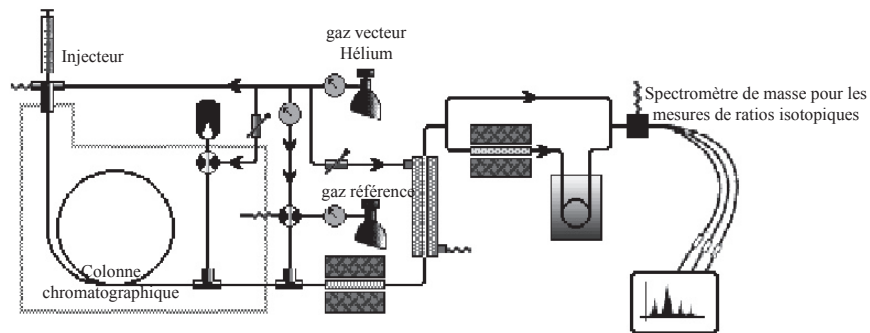


Figure 28 : Schéma simplifié d'un type de GC-irMS (adapté de Meier-Augenstein, 2004).

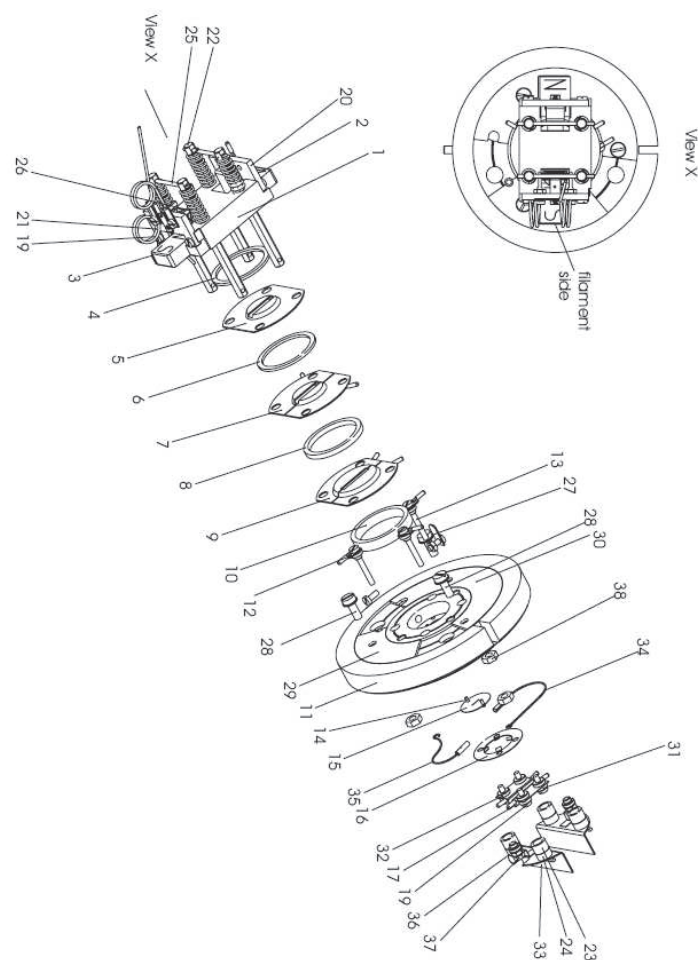


Figure 29 : Vue d'ensemble des constituants de la source (source : ThermoFisher).





Figure 30 : Photos lors du démontage de la source (source : Blog PalHydroMil). A : Source avant démontage. B : Vue extérieure de la partie inférieure de la source. C : Vue de l'intérieur de la source avant nettoyage avec les pièces dirigeant le faisceau d'atomes. D : Pièces nécessitant un nettoyage.

### 3. Vérifications des conditions d'analyse

La vérification des conditions d'analyses est réalisée soit au moyen de standards (molécules ou séries de molécules dont la composition isotopique a été déterminée hors-ligne) soit au moyen de gaz de référence dont la composition isotopique est définie par rapport à celle standards.

#### a) Gamme de linéarité – H3Factor

Le H3Factor sert à vérifier la linéarité des mesures  $\delta D$  pour des amplitudes de signal différentes. Il est déterminé en routine en injectant depuis le Conflo une quantité croissante de  $H_2$  dans la source. Cette linéarité permet de définir à la fois la fidélité des mesures en fonction d'une quantité croissante de gaz mais aussi la justesse puisqu'il s'agit du même gaz.

#### b) Test de répétabilité / Test de justesse

Le test de répétabilité consiste à vérifier la linéarité des mesures au cours du temps. Il faut premièrement se trouver dans la gamme de linéarité, puis injecter le même échantillon plusieurs fois. C'est le rôle du  $H_2$ Zéro qui consiste en 8 pulses à la même amplitude de gaz référence.

#### 4. Standards

##### a) Standards de Arndt Schimmelmann – Standard externe / interne

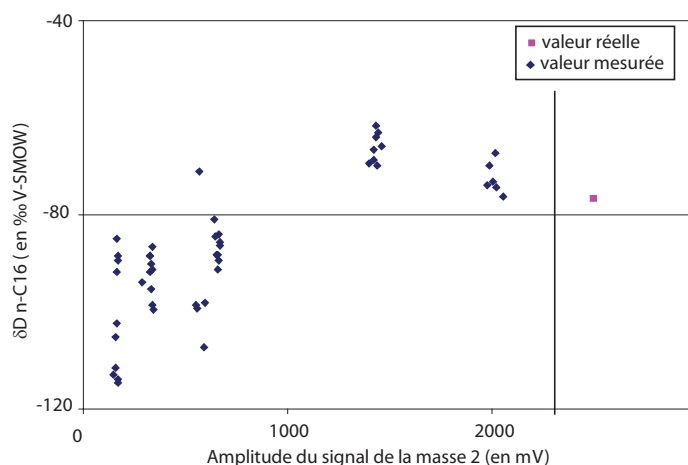
Si le gaz de référence est utile pour vérifier le bon fonctionnement du spectromètre de masse au quotidien, il ne permet pas de s'assurer du bon fonctionnement des équipements en amont (GC, interface de conversion thermique ; Figure 28). J'ai utilisé des molécules de référence (dont la composition isotopique a été préalablement déterminée "off-line" - c'est-à-dire en EA-irMS) par le fournisseur. Il s'agit d'une série de 15 *n*-alkanes de *n*-C<sub>16</sub> à *n*-C<sub>30</sub> fournis par Arndt Schimmelmann (Mélange B3, Indiana University). Les *n*-alkanes sont des composés lipidiques couramment analysés dans le laboratoire et dont les procédés utilisés pour mesurer leur valeur isotopique ne devraient pas plus les affecter que celles des composés triterpéniques. Les valeurs  $\delta D$  de ces *n*-alkanes varient de -227,3 à -46,3 (Tableau 3).

Tableau 3 :  $\delta D$  de chacun des *n*-alkanes du standard fournis par A. Schimmelmann.

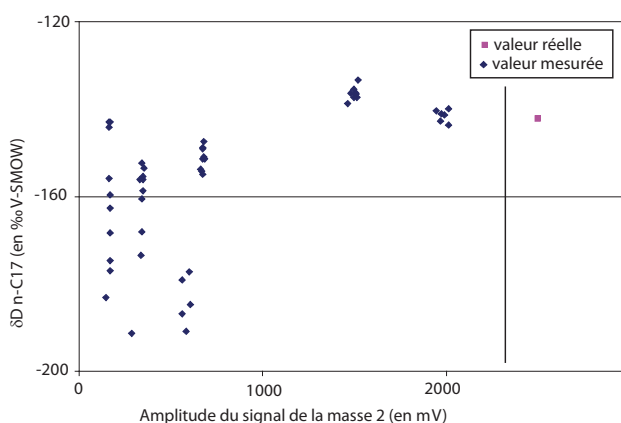
<i>n</i> -alcane	$\delta D$ du composé
<i>n</i> -C16	-76,7 ± 1,7
<i>n</i> -C17	-142,4 ± 1,7
<i>n</i> -C18	-53,8 ± 2,1
<i>n</i> -C19	-118,0 ± 2,0
<i>n</i> -C20	-52,6 ± 0,8
<i>n</i> -C21	-214,7 ± 2,0
<i>n</i> -C22	-62,8 ± 1,6
<i>n</i> -C23	-48,8 ± 1,4
<i>n</i> -C24	-53,0 ± 1,6
<i>n</i> -C25	-125,8 ± 1,6
<i>n</i> -C26	-54,9 ± 1,0
<i>n</i> -C27	-227,3 ± 2,5
<i>n</i> -C28	-49,0 ± 1,5
<i>n</i> -C29	-179,3 ± 2,7
<i>n</i> -C30	-46,3 ± 2,1

Le standard injecté seul est appelé standard externe. Il sert notamment à calibrer le gaz de référence. Ce standard a été utilisé afin de déterminer la linéarité et la justesse de l'appareil en fonction du nombre de carbone du composé. Les tests de linéarité sont exposés pour quatre *n*-alkanes (*n*-C<sub>16</sub>, *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>25</sub> et *n*-C<sub>28</sub>) en Figures 31, 32, 33 et 34. Ces quatre *n*-alkanes sont considérés représentatifs des onze autres. Les valeurs affichées dans les Figures 31 à 34 sont déterminées en considérant le gaz référence à -200 ± 3 ‰. Cette différence est surtout dû au fait que la composition isotopique mesurée pour la population de pics de gaz référence avant l'échantillon est plus appauvrie en D que la composition isotopique de la population des pics de gaz référence après l'échantillon. On peut observer que pour un signal inférieur à 1000mV, la fidélité et la justesse de l'appareil sont mauvaises avec une variabilité de près de 40‰ V-SMOW pour les *n*-C<sub>16</sub>, *n*-C<sub>17</sub>, cette variabilité est légèrement réduite pour les composés plus lourds (à partir du *n*-C<sub>25</sub>) à 30‰ pour une intensité de 500mV. Les valeurs  $\delta D$  obtenues pour une gamme

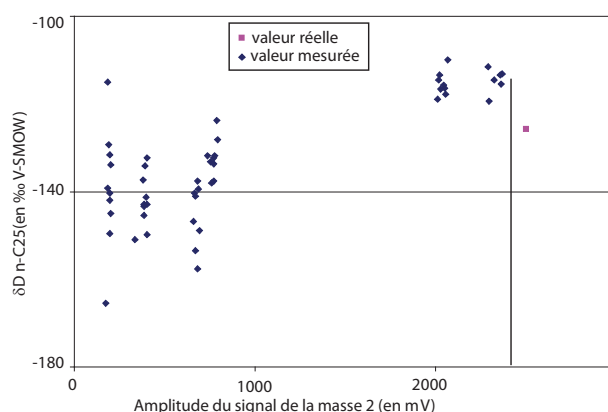
inférieure à 500mV ne sont donc pas répétables. Par contre, on peut observer pour tous les composés un resserrement des écarts entre les valeurs pour des intensités supérieures à 1000mV. Ceci implique que pour optimiser les chances d'obtenir des valeurs justes avec un écart-type faible, il faut injecter des quantités de molécules permettant d'obtenir une amplitude du signal de la masse 2 supérieure à 1500mV. Lors de ma formation chez ThermoFisher, nous avons vu qu'il fallait une amplitude de 1000mV pour valider les mesures, en accord avec nos tests, donc. Pour conclure, ce test avec les *n*-alcane vient de permettre d'identifier la gamme de fidélité de l'appareil. Elle apparaît, pour les *n*-alcane, à partir d'une amplitude de 1000mV.



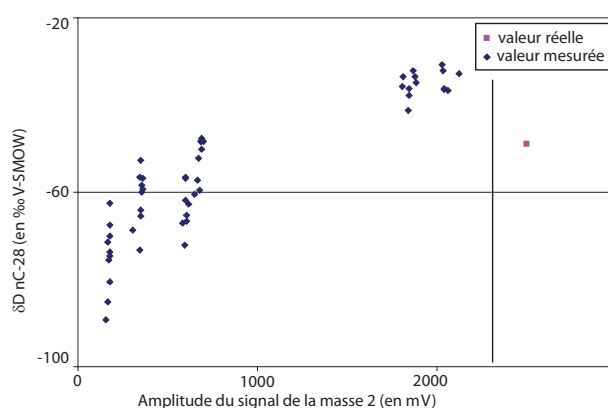
**Figure 31 :  $\delta D$  n-C16 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C16 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).**



**Figure 32 :  $\delta D$  n-C17 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C17 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).**



**Figure 33 :  $\delta D$  n-C25 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C25 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).**



**Figure 34 :  $\delta D$  n-C28 (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de n-C28 injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).**

On peut cependant remarquer que les valeurs ne sont pas exactes puisque la composition isotopique du gaz de référence n'est pas réellement de -200‰. Maintenant que l'on connaît le seuil de fidélité pour les *n*-alcanes, les valeurs de  $\delta D$  des *n*-alcanes serviront à calibrer la valeur  $\delta D$  du gaz.

Dans notre cas, la pureté et l'abondance de la miliacine permettent de la co-injecter avec le standard de Schimmelmänn. Dans ce cas, ce standard sera appelé standard interne, non pas dans le sens standard interne pour standard développé en interne, dans le laboratoire, mais standard interne dans le sens standard injecté avec l'échantillon et qui, à l'intérieur de l'appareil, subira des conditions rigoureusement identiques à notre échantillon. En se servant du standard de Schimmelmänn comme référence, on évite une propagation d'incertitude due à la calibration du gaz par le standard de Schimmelmänn.

#### **b) « Standard » de miliacine et autres rapporteurs**

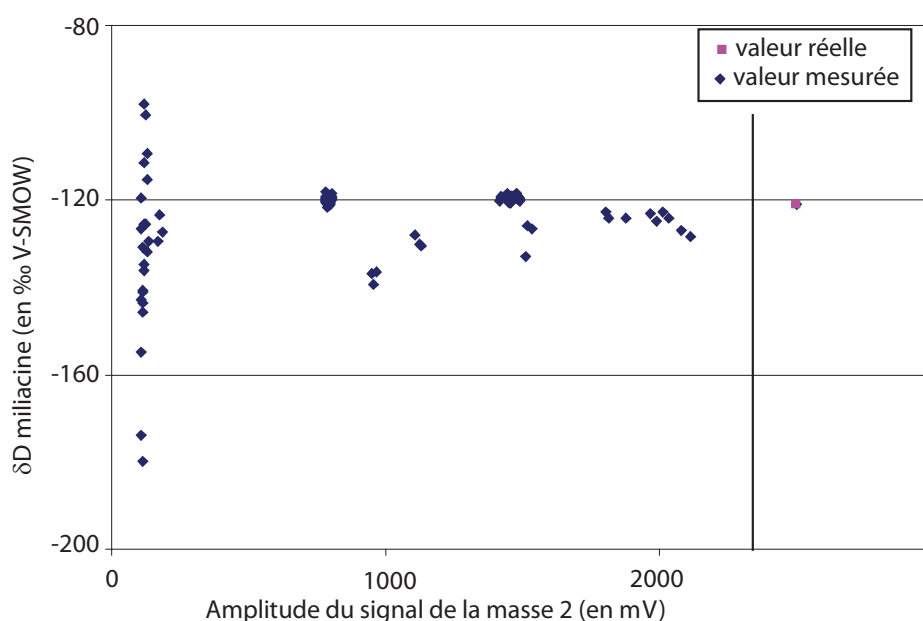
Le standard de Schimmelmänn a un coût certain. C'est pourquoi j'ai essayé de me servir d'un échantillon de miliacine comme rapporteur. C'est-à-dire un standard caractérisé dans le

laboratoire par rapport au standard de Schimmelmman et qui sera ensuite inséré dans la séquence. Il permettra ainsi de savoir si l'appareil connaît une dérive sans utiliser le standard Schimmelmman. L'inconvénient est qu'il ne pourra être utilisé comme standard interne, c'est-à-dire injecté avec notre échantillon. Une alternative serait de mesurer ces valeurs par dilution isotopique, c'est-à-dire qu'on mesure les valeurs  $\delta D_{\text{miliacine}}$  d'un échantillon pauvre en miliacine en y ajoutant de la miliacine dont le  $\delta D$  est parfaitement connu. Une fois le  $\delta D$  miliacine du mélange obtenu, on peut retrouver le  $\delta D$  miliacine de l'échantillon d'origine.

## 5. Echantillons

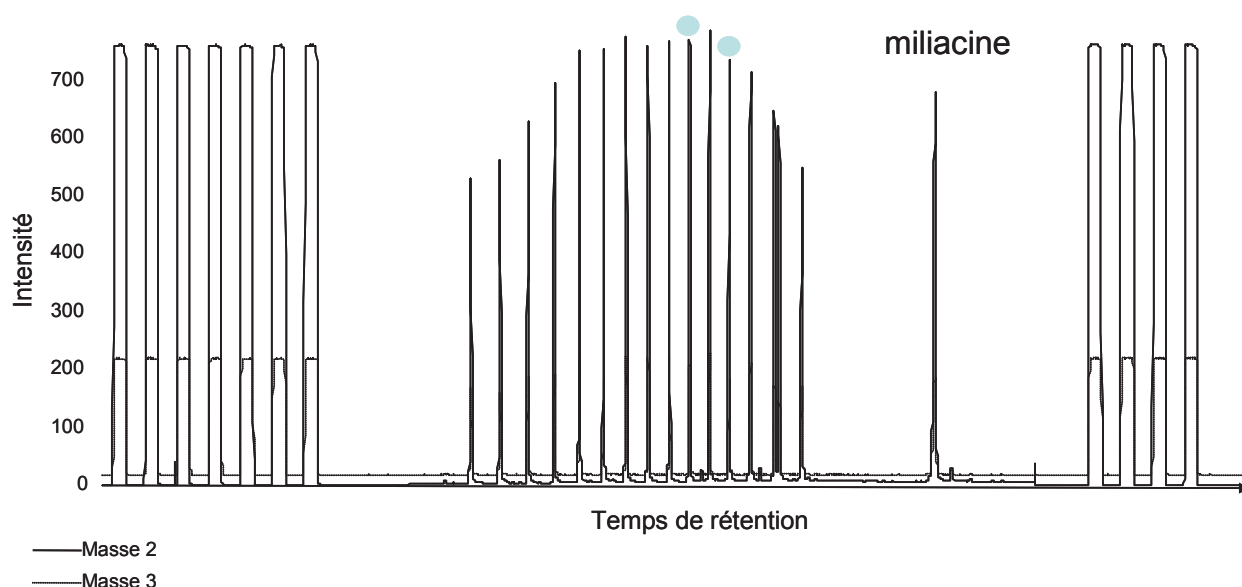
### a) Linéarité du signal – test de quantité

De la même façon que pour le gaz  $H_2$  et le standard de  $n$ -alcanes de Schimmelmman, un test de fidélité et justesse a été réalisé pour la miliacine. Nous en avons conclu que pour avoir des valeurs fidèles, il nous fallait être dans une gamme d'amplitude comprise entre 700 et 2000mV pour la masse 2 (Figure 35). Cependant, pour la justesse, il faut calculer le  $\delta D$  miliacine à partir de  $\delta D$  connu des  $n$ -alcanes de Schimmelmman.



**Figure 35 :  $\delta D$  miliacine (calibrée en fonction des  $n$ -alcanes de Schimmelmman) (en ‰ V-SMOW) en fonction de la quantité de miliacine injectée représentée par l'amplitude de la masse 2 (en mV).**

Les valeurs  $\delta D$  miliacine sont justes et fidèles lorsqu'elles sont calibrées en fonction du standard de Schimmelmman et pour des amplitudes de 700mV ou plus de la masse 2.



**Figure 36 : Chromatogramme typique de la mesure  $\delta D$  de la miliacine. Les points bleus représentent les 2  $n$ -alcanes sur lesquels la calibration des mesures a lieu. 12 autres  $n$ -alcanes sont utilisés pour le suivi temporel des conditions d'analyse.**

La Figure 36, illustre un chromatogramme-type lors de la détermination du  $\delta D$  de la miliacine. L'analyse est constituée de 7 pics de gaz référence, puis du standard interne avec les 15 pics correspondants aux 15  $n$ -alcanes. Les pics identifiés par un point bleu sont ceux servant à calibrer les mesures. Le  $n$ -C<sub>29</sub> coélue avec le 5 $\alpha$ -cholestane utilisé pour la quantification des composés en GC-MS. Par conséquent, seuls les 12 autres  $n$ -alcanes sont utilisés pour vérifier les conditions de l'appareil. L'analyse se termine avec le pic de la miliacine et enfin 4 pics de gaz référence. Les pics de gaz référence sont conservés afin de permettre le suivi des 14  $n$ -alcanes dans le temps pour la fiche de suivi de l'appareil.

#### **b) Justesse ou fidélité ?**

Lorsque l'on a mesuré le  $\delta D$  de la miliacine des plantes ou du sol de Mézières, les quantités en miliacine disponible permettaient largement d'assurer des mesures de qualité. Par contre, pour mesurer le  $\delta D$  de la miliacine retrouvée dans les sédiments, cette question devient essentielle du fait de faibles quantités en miliacine qui n'ont, pour la plupart des échantillons, pas permis de se retrouver dans la zone de fidélité de l'appareil, et donc d'obtenir des mesures fiables. La justesse n'a pu être améliorée en utilisant une quantité en miliacine de la même intensité comme référence.

### **6. Séquence**

Comme décrit précédemment, afin de vérifier les conditions d'analyses, des standards, H<sup>3</sup>factor et autres H<sub>2</sub>zéro sont intercalés entre les différents échantillons. C'est-à-dire pour vérifier que les valeurs isotopiques du gaz référence n'ont pas dérivé. De plus, pour éviter d'avoir des valeurs  $\delta D$  miliacine conduites par les conditions analytiques, nous avons toujours séparé les

réplicats du même échantillon (i.e. qu'ils ne sont jamais passés à la suite). Par ce biais, la justesse est certes réduite, mais la fidélité des valeurs  $\delta D$  est meilleure.

**Tableau 4 : Séquence type d'analyse en GC-irMS. Std : Standard de 15 *n*-alcane ; Ech : échantillon. La lecture se fait de gauche à droite puis de haut en bas.**

H2Zéro	H2Zéro	H2Zéro	H3factor
Std	Std	Std	Std
Ech1	Ech2	Ech3	Ech4
Std	Ech5	Ech6	Ech7
Ech8	Std	Std	H2Zéro
H2Zéro	H2Zéro	H3factor	Std
Std	Std	Std	Ech4
Ech3	Ech2	Ech1	Std
Ech8	Ech7	Ech6	Ech5
Std	Std	H2Zéro	H2Zéro
H2Zéro			

## 7. Méthodes analytiques

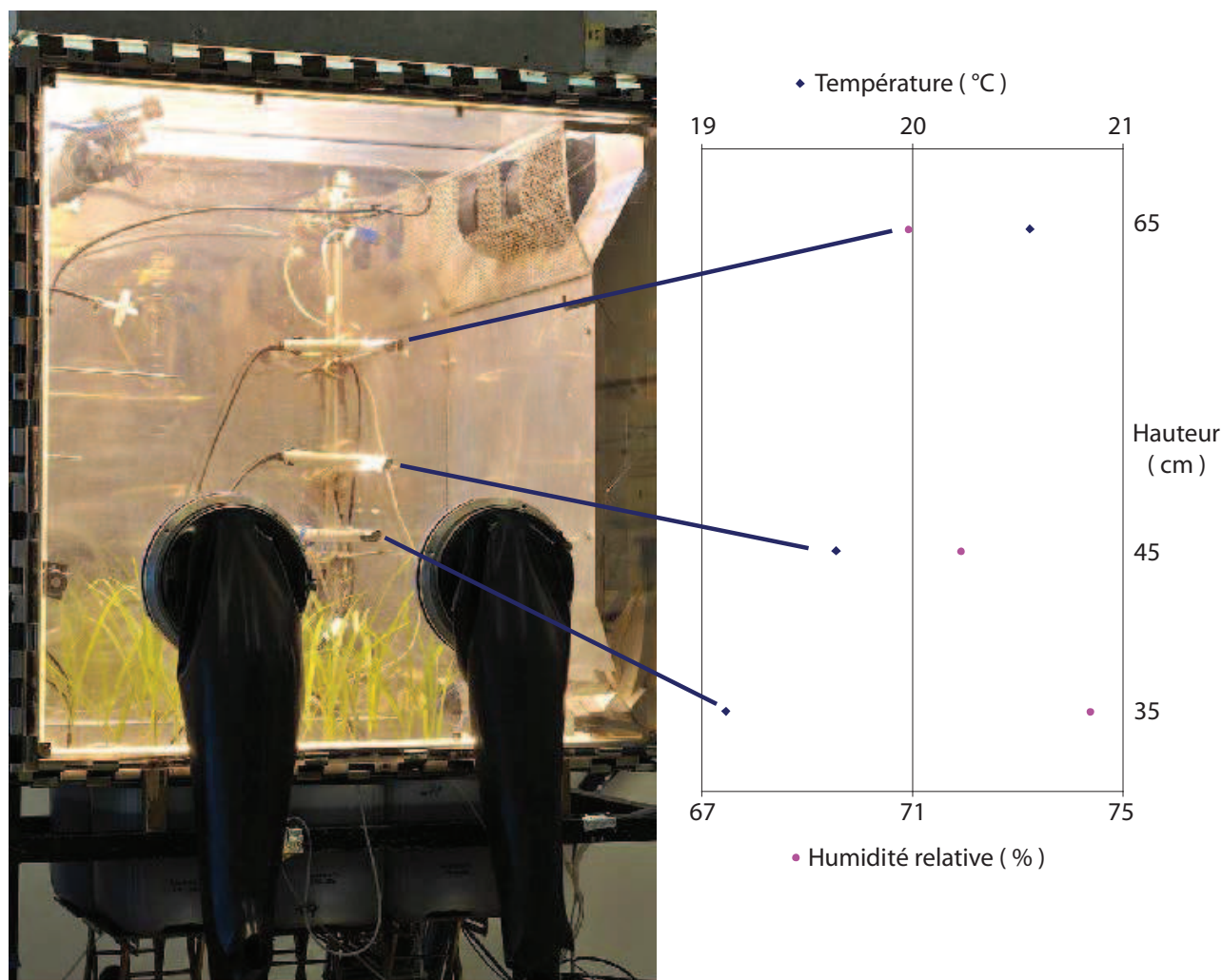
Les derniers tests réalisés sur cet appareil ont été les tests de méthode pour les appareils. Différentes programmations du four GC ont été vérifiées afin de n'entraîner aucun fractionnement lors de l'analyse. Il en ressort que le  $\delta D$  des composés analysés est indépendant de la vitesse de chauffe du four de GC. Le flux d'hélium peut varier de 1 à 1.4ml sans induire non plus un quelconque impact sur le  $\delta D$ . Et enfin, la température initiale du four GC n'impacte pas le  $\delta D$  des composés (testé pour 40 et 60°C).

La formation que j'ai pu acquérir au centre ThermoFisher de Bremen m'a permis de voir que nos méthodes de traitement des chromatogrammes étaient correctes (bruit de fond, méthode automatique de détection des pics...). Cette formation m'a aussi fourni les bases pour la maintenance de la source de la GC-irMS. Claude LeMilbeau m'ayant formé à l'entretien de la partie GC.



### C. Chambres climatiques

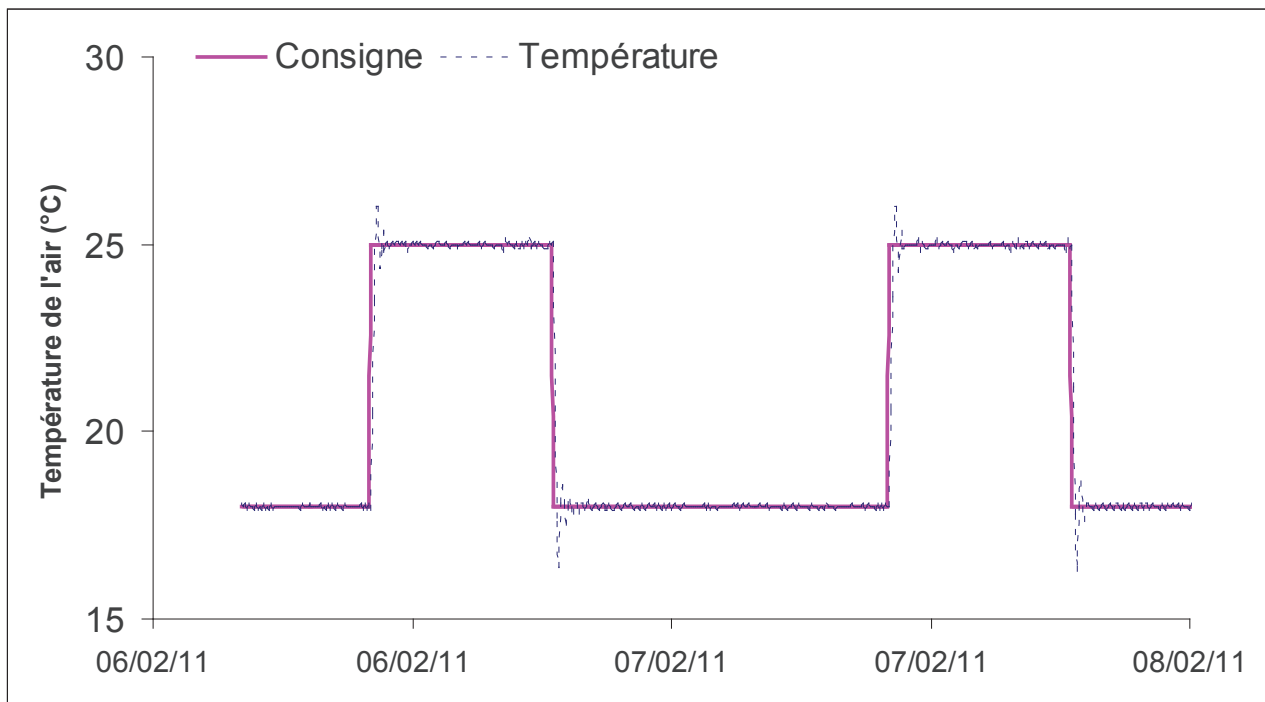
Afin de simuler différentes conditions hydrologiques, j'ai réalisé des cultures de millet dans des chambres climatiques au Laboratoire Bioemco. Ces chambres climatiques permettent le contrôle de l'environnement de la plante en agissant sur différents facteurs tels que la température, l'humidité, l'intensité lumineuse .... En plus de contrôler ces facteurs, les chambres climatiques autorisent une caractérisation des conditions environnementales tout au long de l'expérience grâce à la présence de capteurs (pour la température, l'humidité, pression atmosphérique...) qui mesurent les conditions régnant pour les plantes (Figure 37).



**Figure 37 : Chambre climatique Rubic1 avec ses capteurs et les mesures données à un moment de la culture.**

La justesse des appareillages est contrôlée par l'affichage au cours du temps des valeurs mesurées des paramètres en vis-à-vis des consignes. On peut d'ailleurs remarquer que lors des switches jour/nuit et nuit/jour, les valeurs données pour consigne sont atteintes après 30minutes (Figure 38).





**Figure 38 : Température de l'air consignée et mesurée dans Rubic 1 au cours de la culture.**

Les mêmes types de graphiques ont été obtenus pour l'hygrométrie, l'éclairement, la concentration en  $\text{CO}_2$ , le débit de  $\text{CO}_2$  et la surpression. En plus de ces valeurs, l'humidité est contrôlée via le point de rosée, c'est-à-dire la température de condensation de l'eau vapeur dans la chambre. Les condensats sont ensuite récupérés, ce qui donne la possibilité de connaître le cycle complet des isotopes de l'eau, puisque l'on peut déterminer ce qui entre dans le système via la solution hydroponique et ce qui sort par les condensats. Les chambres climatiques sont essentielles afin de contraindre l'environnement dans lequel les plantes croissent et de permettre la calibration, mais cela requiert d'importants moyens humains et financiers pour leur entretien.

## CHAPITRE III - PERTINENCE

Avant de calibrer ce nouvel outil de reconstitution paléohydrologiques pour éventuellement quantifier les variations hydrologiques qui sont survenues dans le bassin versant du lac du Bourget, j'ai voulu **tester** la fiabilité de cet outil. Comme indiqué en introduction, la majeure partie des études s'appuyant sur le  $\delta D$  moléculaire se focalisent sur les *n*-alcane, composés abondants et ubiquistes dans les sédiments mais très peu spécifiques, ce qui donne peu d'espoir de quantification fine des variations des paramètres environnementaux. A l'inverse, la spécificité de la miliacine des sédiments du Lac du Bourget vis-à-vis de *P. miliaceum* offre une opportunité unique d'obtenir des enregistrements robustes des changements environnementaux.

Néanmoins, les sédiments lacustres intègrent l'ensemble des éléments produits dans le bassin versant, dont les biomarqueurs moléculaires. Si le  $\delta D$  de biomarqueurs moléculaires préservés dans les sédiments lacustres est le reflet des conditions environnementales ayant régné dans le bassin versant, alors il est essentiel de se poser un ensemble de questions, par ailleurs également identifiées par Sachse et al. (2012) :

- Dans quels cas la miliacine peut-elle être réellement considérée comme spécifique de *P. miliaceum* ?

Le principal et premier postulat du projet PalHydroMil est que la miliacine détectée dans les sédiments du lac du Bourget datés de l'âge du Bronze est spécifique de *P. miliaceum*. C'est cette première hypothèse de spécificité que j'ai testé en analysant la distribution de la miliacine dans différentes sources potentielles.

- Quelle est la variabilité du  $\delta D$  de la miliacine dans des plantes se développant sur un bassin versant ? Que représente-t-elle par rapport aux variations du  $\delta D$  moléculaire dans les archives ?

Pour répondre à cette question, j'ai mesuré le  $\delta D$  miliacine de plants de millet cultivés dans un champ à Mézières-lez-Cléry (Loiret, France). J'ai ensuite comparé les écarts à la moyenne observés dans ce champ aux variations temporelles décrites dans la littérature pour des changements hydrologiques passés.

- Comment la plante, à travers la miliacine, enregistre-t-elle le  $\delta D$  de l'eau météorique ?

Les plantes cultivées sur ce champ ont été échantillonnées sur quatre ans (2009, 2010, 2011, 2012) et les valeurs  $\delta D$  miliacine de ces plants ont été comparées aux valeurs  $\delta D$  des eaux météoriques. Ceci afin de vérifier que les plantes enregistrent les variations annuelles du  $\delta D$  des eaux météoriques en conditions naturelles.

- Quelle est la valeur du  $\delta D$  de l'eau du sol utilisée par la plante ?

Nous avons profité du stage d'IUT (Génie Biologique Option Génie de l'environnement, de Mars à Juillet 2011) de Manon Bécharde que j'ai encadré pour prélever deux carottes de sol en mars 2011 afin de mesurer les valeurs isotopiques de l'eau contenue dans le sol et ainsi observer la variabilité spatiale, horizontale et verticale, des valeurs isotopiques de l'eau du sol.

- Comment la variabilité des  $\delta D$  de la miliacine observée dans les plantes du champ est-elle transférée au sol ?

Dans le cadre de son stage, Manon Bécharde a mesuré la moyenne et la variabilité des valeurs de  $\delta D$  de la miliacine préservée dans le sol champ dans lequel l'étude de variabilité au sein des plants a été réalisée. Il ne s'agissait pas de comprendre les effets liés au transport complet source (plante) -> archive (sédiment), mais de la première étape de ce transport, de la plante au sol. L'objectif est d'identifier un éventuel décalage entre les valeurs de  $\delta D$  de la miliacine de la plante et celui de la miliacine du sol, et d'en rechercher d'éventuelles causes, dans l'esprit de ce qui a été réalisé dans une étude précédente (Chikaraishi et Narakoa, 2006). C'est-à-dire vérifier si une dégradation de la miliacine avait lieu lors de son archivage dans les sols.

- Dans quelle mesure le  $\delta D$  de la miliacine est-il archivé de manière homogène dans des sédiments de deux sites distincts et pourtant représentatifs du même bassin versant ?

Je comparerai les rares valeurs de  $\delta D$  de la miliacine obtenues sur la carotte LDB04 forée au centre du Lac du Bourget avec les valeurs de  $\delta D$  de la miliacine qui ont été mesurées dans une carotte prélevée dans un fumier du site archéologique de Chatillon/Chindrieux, daté de l'âge du Bronze,

Cette partie, indispensable pour connaître les limites de l'utilisation du  $\delta D$  miliacine comme indicateur des variations hydrologiques, nous permettra d'envisager ou non la calibration du  $\delta D$  de la miliacine afin de disposer d'un indicateur robuste des conditions hydrologiques dans lesquelles *Panicum miliaceum* se développait.

## A. Spécificité de la miliacine comme traceur de *Panicum miliaceum*

Cette partie constitue un article publié dans Organic Geochemistry : Bossard, N., Jacob, J., LeMilbeau, C., Sauze, J., Terwilliger, V., Poissonnier, B., Vergès, E. Distribution of miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether) and related compounds in broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) and other reputed sources: Implications for the use of sedimentary miliacin as a tracer of millet. Octobre 2013, Vol. 63, pp 48 – 65.

### 1. Résumé en français

L'utilisation de la miliacine (olean-18en-3 $\beta$ -ol methyl ether) comme traceur univoque de l'histoire de la culture de *Panicum miliaceum* (millet commun) est dépendante de sa réelle spécificité à cette plante. La synthèse de miliacine a en effet aussi été décrite chez d'autres espèces de millets du genre *Panicum*, mais aussi dans le genre *Setaria* (millet italien ou millet des oiseaux), ce qui pourrait induire des limites dans l'interprétation de la présence de miliacine dans les sédiments. Nous avons étudié la concentration de la miliacine dans différentes variétés de *P. miliaceum*, ainsi que dans différentes espèces de *Panicum* et *Penissetum*, dans *Setaria italica* (espèces anciennement cultivées dont les graines sont conservées dans divers instituts) et dans *Chaetomium olivaceum*. L'analyse de différents organes de *P. miliaceum* montre que la miliacine est concentrée dans la graine, tout en étant absente des glumes et glumelles et des racines, mais cependant présentes dans de faibles quantités dans les feuilles et les tiges. Une importante et identique concentration de miliacine a été retrouvée dans des graines de *P. miliaceum* ayant été cultivé dans un champ, dans des chambres climatiques ou ayant poussé comme plantes adventices dans des champs. La miliacine a été retrouvée pour quelques espèces de *Pennisetum* mais pas dans *Setaria italica*. Après trois semaines de mise en culture de *C. olivaceum*, ce champignon et son milieu de culture n'ont pas montré la présence de miliacine. Ayant exclu *Setaria italica* et *Chaetomium olivaceum* comme contributeurs potentiels de miliacine, ayant montré la forte concentration en miliacine dans les graines de *P. miliaceum*, et considérant la forte biomasse que représente cette plante lorsqu'elle est cultivée, nous avons renforcé l'hypothèse selon laquelle la miliacine sédimentaire peut être utilisée, dans certains contextes, comme traceur de la culture du millet commun *P. miliaceum*.

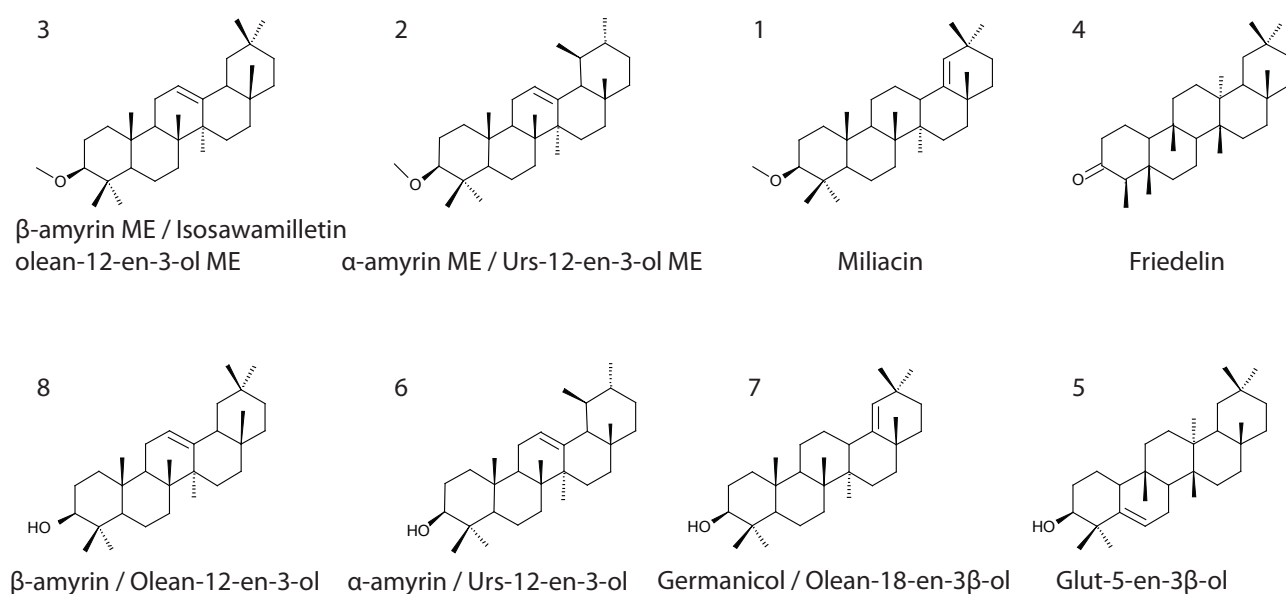
### 2. Abstract

Using sedimentary miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether) as a molecular tracer of the history of *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) cultivation depends upon broomcorn millet being sedimentary miliacin's dominant source. It also requires knowledge of the variability in miliacin concentration in broomcorn millet. Finally, it is affected by the presence of other pentacyclic triterpene methyl ethers (PTMEs) that may exist in conjunction with miliacin in other sources but not in broomcorn millet.

Miliacin biosynthesis has been proposed for other *Panicum* species, *Setaria italica* (Italian or foxtail millet), *Pennisetum* sp. and *Chaetomium olivaceum* (an olive green mold). We found miliacin concentration in seeds of different varieties of *P. miliaceum* to be similarly high (with trace amounts of  $\beta$ - and  $\alpha$ -amyrin methyl ethers). It was absent from hulls and roots, and nominally present in leaves and stems. The transfer of miliacin from plant to sediments is therefore mostly from seeds. It was abundant (often with larger amounts of  $\beta$ - and  $\alpha$ -amyrin methyl ethers) in all other *Panicum* species studied, but only in some species of the genus *Pennisetum* and was absent from *S. italica*. Neither *C. olivaceum* nor its growth medium (rice) showed any trace of miliacin. Our results, with miliacin absent from *S. italica* and *C. olivaceum*, its high concentration in the seed of *P. miliaceum* relative to other PTMEs and to other grasses and, considering the high biomass that cultivated broomcorn millet has relative to other potential plant sources, support the use of sedimentary records of miliacin in some contexts to track past millet agricultural dynamics.

### 3. Introduction

Molecular biomarkers archived in geological materials such as sediments are preserved or modified compounds whose source is restricted to a limited number of taxa. Temporal records of such compounds can provide information about the history of the source organisms. The combination of advances in understanding the distributions of given phytochemicals within organisms and of evolutionary trends in biosynthesis provides key information for identifying new biomarkers that can help discern past trends in vegetation. C-3 oxygenated pentacyclic triterpenes are such compounds. Their potential use in medicine (Das and Mahato, 1983; Mors *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Siddique and Saleem, 2011) motivated phytochemical studies that have increased understanding of their distributions in plants (Xu *et al.*, 2004). Although compounds such as lupeol, and  $\beta$ - and  $\alpha$ -amyrin are found in most angiosperms (i.e. Das and Mahato, 1983), several pentacyclic triterpenes bearing original functional groups can be more taxon specific. Examples from multiple sedimentary sources (Jacob *et al.*, 2005; Oyo-Ita *et al.*, 2010) include those having an acetate function at C-3, that are restricted predominantly to Asteraceae (Lavrieux *et al.*, 2011), and those bearing a methyl ether (ME) function at C-3 that are constrained to *Poaceae* (Ohmoto *et al.*, 1970a).



**Figure 39 : Structure of compounds discussed in the text.**

The ideal biomarker has a structure unique to a one species source. In practice, a useful biomarker has an overwhelmingly dominant source in a given environmental context. This is what we hypothesized when miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether; Fig. 1) was detected in sediments from Lake Bourget in the French Alps. Coupling of a carpological inventory of a Bronze Age settlement on the lake shore with a literature search of the taxonomic occurrence of miliacin (with the exception of any other PTME) led Jacob *et al.* (2008a) to propose that *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) was the only source of the compound in these sediments. The hypothesis was supported by  $\delta^{13}\text{C}$  measurements demonstrating that, although miliacin can be produced by  $\text{C}_4$  and  $\text{C}_3$  plants, the compound in Lake le Bourget sediments was exclusively of  $\text{C}_4$  origin (Jacob *et al.*, 2008b) and *P. miliaceum* was the only  $\text{C}_4$  plant likely to have produced that isotopic signal. Because miliacin is resistant to degradation, changes in its content in sediments were then used to infer when millet cultivation began and subsequent fluctuation in its production in the catchment (Jacob *et al.*, 2009). Since these pioneering studies, miliacin has also been detected in sediments from other lakes (Simonneau *et al.*, 2013) and in paleosols (Motuzaite-Matuzeviciute *et al.*, in press) where it was interpreted as a tracer of former millet cultivation.

The presence of a high concentration of miliacin in *P. miliaceum* has long been known (Ito, 1934; Abe, 1960). However, it is not unique to *P. miliaceum*. Its pharmaceutical potential and role as an anti-microbial/anti-fungal agent led to a search for its presence in other plant species (Panfilova *et al.*, 2003, 2006; Hoeller Obrigkeit *et al.*, 2006; Zheleznova *et al.*, 2007). Most reputed miliacin producers are also of the Poaceae family, including *Eragrostis ferruginea*, *Miscanthus floridulus*, *Panicum dichotomiflorum*, *Paspalum dilatatum*, *Microstegium vimineum*, *Syntherisma sanguinalis*, *Glyceria acutiflora* (Ohmoto *et al.*, 1970a), several *Chionochloa* spp. (Connor and Purdie (1976, 1981) and, most recently, *Setaria italia* (Lu *et al.*, 2009). Of these, only *S. italia*

(foxtail or Italian millet) was abundantly cultivated by Bronze Age populations around Lake Bourget (Bouby and Billaud, 2001), so it is the only species likely to confound an interpretation of the agricultural history of *P. miliaceum* from the sedimentary record of miliacin there. Consequently, if *S. italica* were to synthesize significant quantities of miliacin, this biomarker could only be used as a general tracer of the two millets (broomcorn and foxtail) in the Lake Bourget area. Finally, in one study (Smetanina *et al.*, 2001, cited also by Volkman, 2005 and Lebar *et al.*, 2007) miliacin was detected in *Chaetomium olivaceum*, a fungus that can develop on cereal seeds and in sediments. If *C. olivaceum* could synthesize miliacin in sufficient quantities, then the use of miliacin as a biomarker would be questionable in many situations.

One objective of this study was to explore the occurrence of miliacin in *P. miliaceum* and related plants (e.g. *Setaria sp.*, *Pennisetum sp.*, *Panicum sp.*) of significance to archaeological contexts such as those surrounding Lake le Bourget. We also examined the distribution of miliacin in the different organs of *P. miliaceum* in order to identify the biomass that could be responsible for its dissemination in soils and sediments. Because the hypothesis of Jacob *et al.* (2008a,c), proposing miliacin as a tracer of *P. miliaceum*, relies on the absence of other PTMEs from the sediment [only miliacin was detected in *P. miliaceum* by Ito (1934) and Ohmoto *et al.* (1970a,b)], we also screened all the sources analyzed for other PTMEs. In addition, we reproduced the experiment of Smetanina *et al.* (2001) in order to test their finding of miliacin in *C. olivaceum*. Finally, we evaluate the transfer of miliacin and other pentacyclic triterpenes from plant to soil in a field cultivated for broomcorn millet, discuss eventual transformations that could affect miliacin and other PTMEs during early diagenesis and, in the light of the results, provide guidelines for using sedimentary miliacin as a tracer of *P. miliaceum* cultivation.

## **4. Materials and methods**

### **a) Plant, seed and soil collection**

The list of samples is given in Table 1 for *P. miliaceum* and in Table 2 for other species. *P. miliaceum* seeds of the “sunrise” subspecies were collected from 76 plants at maturity from a cultivated field in Mézières-lez-Cléry, France (Bossard *et al.*, 2011). For two of them, leaves, roots and stems were also analyzed. From the same field, we collected 20 top soil (0–2 cm) samples. *P. miliaceum* subsp. *ruderal* seeds were collected from plants in the Vendée region of France, some being described by Poissonnier (1994). These plants are considered to originate from formerly cultivated millet that survives today as an adventive weed. Seeds from the “sunrise” strain and from a variety with black seeds collected at Saint Hilaire la Forêt (France; Table 1) were allowed to germinate and were then grown in a greenhouse at the BioEMCo laboratory (Thiverval-Grignon, France). Leaves, roots and seeds of the “sunrise” strain and seeds of the variety with black seeds from Saint Hilaire la Forêt were collected at maturity. Several *Panicum spp.* and *Pennisetum spp.* seeds were acquired from the Kew Seed Database (<http://www.kew.org> – Table 2). We report only the presence or absence of specific pentacyclic triterpenes in the Kew samples as their abundance



was too small to permit quantification of concentration. *S. italica* seeds from 2 different varieties were purchased from a local pet shop.

### **b) Cultivation of *C. olivaceum***

The *C. olivaceum* strain was provided by the French Museum of Natural History and isolated from immersed wood. Cultivation followed the protocol described by Smetanina *et al.* (2001). Briefly, it was grown in a 500 ml flask at room temperature for 3 weeks on a medium consisting of *Oriza sativa* (rice) seeds (commercial) and water with the following proportions (g): sodium tartrate, 0.01; rice, 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01; sea water, 40. The only difference from the protocol of Smetanina *et al.* (2001) was that they used yeast extract and we did not since enzymes in yeast extracts could biotransform pentacyclic triterpenes (Bastos *et al.*, 2007; Muffler *et al.*, 2011). The possibility that yeast and not *C. olivaceum* resulted in miliacin being present in their experiment but not ours cannot be discounted. Smetanina *et al.* (2001) did not mention whether seeds or leaves of *Oryza sativa* were used as a substrate for their experiment. We assumed that Smetanina *et al.* (2001) used seeds and not leaves as a substrate for the following reasons. First, 20 g of leaves would not readily fit into a 500 ml flask. Second, seeds have the highest sugar content and can thus produce the greatest quantity of fungi.

### **c) Lipid extraction and purification**

Each of the following parts of *P. miliaceum* subsp. sunrise was analyzed separately: seeds, hulls (lemmas, paleas and glumes), leaves and stems. The seed (bran, endosperm and embryo) was the only plant part analyzed for the other taxa. Plant material and soil material were dried at 40 °C in an oven and ground to powder with a mortar and pestle. *C. olivaceum* (C.o) was manually separated from the rice on which it developed (rice-C.o). C.o, rice-C.o and a control consisting of untreated rice were dried for 48 h in an oven at 40 °C and ground to powder. Lipids were ultrasonically extracted (3 times) with dichloromethane (DCM):isopropanol (2:1) and the extracts combined. The total lipid extract was separated into neutral, acidic and polar fractions on a Pasteur pipette filled with aminopropyl bonded silica. The neutral fraction was collected after elution with DCM:isopropanol 2:1.

For plant material, the neutral fraction was separated using flash chromatography on silica (activated at 120 °C for 24 h, then deactivated with H<sub>2</sub>O at 5% by wt.) into aliphatic and aromatic hydrocarbons, ethers, esters and ketones, and alcohols by sequential elution with solvent of increasing polarity as described by Jacob *et al.* (2008b). All fractions were dried under a stream of N<sub>2</sub> and stored at -18 °C until analysis using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). 5 $\alpha$ -Cholestane was added as internal standard prior to GC–MS, for quantification purposes. The fraction that contained sterols and triterpenols was silylated with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide in pyridine. For soil samples, the neutral fraction was not separated and was not derivatised prior to GC–MS.



#### **d) Lipid identification and quantification**

Lipids were assigned and quantified using GC–MS with a Trace GC Ultra gas chromatograph coupled to a TSQ Quantum XLS mass spectrometer equipped with an AS 3000 autosampler (both Thermo-Scientific, Bremen, Germany). The GC instrument was fitted with a TG-5 MS column (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness; Thermo, Bellefonte, PA, USA). The temperature programme was: 40 °C (1 min) to 120 °C at 30 °C min<sup>-1</sup> and then to 300 °C (held 70 min) at 3 °C min<sup>-1</sup>. The sample was dissolved in toluene and 2  $\mu$ l were injected in splitless mode at 280 °C. The carrier gas was He at 1.0 ml min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated in the electron ionization (EI) mode at 70 eV and scanned from m/z 50 to 600. Compounds were identified on the basis of their mass spectral data, and, when available (miliacin, olean-12-en-3 $\beta$ -ol ME, urs-12-en-3 $\beta$ -ol ME, germanicol), by comparison with authentic standards. Key mass spectral data are provided in Table 1.

Tableau 5 : Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of pentacyclic triterpenes in parts of *Panicum miliaceum* (n.d., not detected).

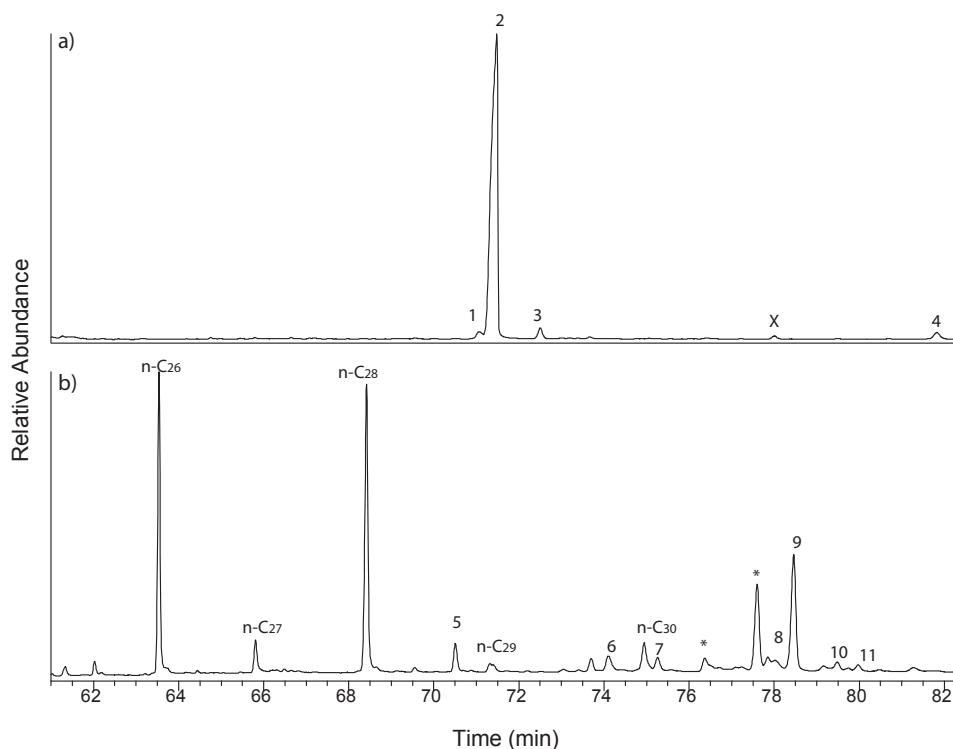
Species	Variety	Origin	Organ	Sampling date	Olean-18-en-3 $\beta$ -ol ME (miliacin)	Olean-12-en-3 $\beta$ -ol ME (Isosawamillelin)	Urs-12-en-3 $\beta$ -ol ME	DA-Friedooleanan-3-one (friedelin)	Olean-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -amyirin)	Urs-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -amyirin)	Olean-18-en-3 $\beta$ -ol (germanicol)	D:B-Friedoolean-5-en-3 $\beta$ -ol (glutinal)
<i>Panicum miliaceum</i>	Sunrise	Mézières-lez-Cléry, France	Leaves	2010	7.5	n.d.	n.d.	111.2	2.6	7.1	30.5	2.2
	Sunrise	Mézières-lez-Cléry, France	Roots	2010	23.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Sunrise	Mézières-lez-Cléry, France	Seeds	2010	306	3.2	4.2	11	6.9	4.1	6.2	2.8
	Sunrise	Mézières-lez-Cléry, France	Stems	2010	171	1.8	2.9	n.d.	7.2	5.3	8.3	n.d.
	Sunrise	Mézières-lez-Cléry, France	Glume	2010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Sunrise	Greenhouse / Bioemco <sup>a</sup>	Seeds	2011	424	4.5	5.7	41.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Sunrise	Greenhouse / Bioemco <sup>a</sup>	Roots	2011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Black seeds <sup>b</sup>	St Hilaire la Forêt, France	Seeds	1990	399	n.d.	n.d.	17.1	n.d.	n.d.	0.9	n.d.
	Black seeds <sup>c</sup>	St Hilaire la Forêt, France <sup>b</sup>	Seeds	2011	413	n.d.	n.d.	40.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Yellow seeds <sup>c</sup>	St Hilaire la Forêt, France	Seeds	1990	368	n.d.	n.d.	26.2	1.9	0.2	0.9	n.d.
	Black seeds <sup>c</sup>	St Vincent sur Graon, France	Seeds	1991	448	n.d.	n.d.	12.3	n.d.	n.d.	1.6	n.d.
	A <sup>c</sup>	CAIRN <sup>d</sup>	Seeds	1990	323	n.d.	n.d.	23.8	n.d.	n.d.	1.2	n.d.
	B <sup>c</sup>	CAIRN <sup>d</sup>	Seeds	1990	436	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	C1 <sup>c</sup> Small spiklets	CAIRN <sup>d</sup>	Seeds	1991	408	n.d.	n.d.	20.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	C2 <sup>c</sup>	CAIRN <sup>d</sup>	Seeds	1992	476	n.d.	n.d.	21.6	n.d.	n.d.	0.5	n.d.
	-	Bougon, France	Seeds	2004	372	n.d.	n.d.	11.2	n.d.	n.d.	0.8	n.d.
	-	Aubigny, Le Baillargeau,	Seeds	2006	331	n.d.	n.d.	4.7	n.d.	n.d.	1.3	n.d.
	-	La Fembrière, France	Seeds	2006	302	n.d.	n.d.	13.8	n.d.	n.d.	1.0	n.d.
	-	Aubigny, La Livraie, France	Seeds	2006	297	n.d.	n.d.	5.5	n.d.	n.d.	1.3	n.d.

<sup>a</sup> Seeds from Mézières-lez-Cléry grown in a greenhouse at Bioemco; <sup>b</sup> Seeds from St Hilaire la Forêt grown in a greenhouse at Bioemco; <sup>c</sup> for a description, see Poissonnier (1994); <sup>d</sup> Centre Archéologique d'Initiation et de Recherche sur le Néolithique, St Hilaire la Forêt, France.

## 5. Results and discussion

### a) Miliacin and other pentacyclic triterpenes in *P. miliaceum*

We screened for pentacyclic triterpenes in different organs of *P. miliaceum* var. sunrise in order to identify the plant parts most susceptible for contributing for miliacin to the soil or sediment. Table 5 summarizes the distribution of pentacyclic triterpenes in the different samples of *P. miliaceum*. Structures are depicted in Fig. 39. The ether/ester/ketone fraction of the seed extract afforded miliacin as the most abundant compound, with minor amounts of  $\beta$ -amyrin ME (isosawamilletin or olean-12-en-3 $\beta$ -ol ME),  $\alpha$ -amyrin ME (urs-12-en-3 $\beta$ -ol ME; Fig. 39) and friedelin (friedelan- 3-one; D:A-friedo-olean-3-one). Apart from phytosterols and n-alcohols that are not discussed further, the alcohol fraction contained (Figs. 39) several triterpenols:  $\alpha$ -amyrin (urs-12-en-3 $\beta$ -ol),  $\beta$ -amyrin (olean-12-en-3 $\beta$ -ol), germanicol (olean-18-en-3 $\beta$ -ol) and glutinol (glut-5-en-3 $\beta$ -ol; D:B-friedo-olean-5-en-3 $\beta$ -ol).



**Figure 40 : Distribution of pentacyclic triterpenes and other compounds on the partial chromatograms of the (a) ethe/ester and ketone, and (b) alcohol fractions of lipids extracted from seeds of *Panicum miliaceum* var. sunrise collected from the field at Mézières-lez-Cléry (France). 1,  $\beta$ -amyrin ME; 2, miliacin; 3,  $\alpha$ -amyrin ME; 4, friedelin; 5, cholesterol; 6, ergosterol; 7, stigmastadienol; 8,  $\beta$ -amyrin; 9, germanicol; 10, glutinol; 11,  $\alpha$ -amyrin; n-C<sub>x</sub>, alcohols.**

Miliacin was detected in the roots, stems, leaves and seeds of *P. miliaceum* var. sunrise grown in the field. The concentration, averaging 306  $\mu\text{g.g}^{-1}$  in the seeds, was far higher than in leaves (7.5  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), roots (23.9  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) or stems (171  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). If the weight of each organ relative to the total

plant biomass is considered, seeds constituted by far the main contributor. This high abundance in the seeds is in agreement with results of the first detection of miliacin in *P. miliaceum* (Ito, 1934). Although Ito (1934) did not specify which organs he analyzed, the weight of material used (133.8 kg) suggests that he analyzed seeds, in which case the miliacin concentration of  $270 \mu\text{g.g}^{-1}$  seeds found by him is very close to that determined for millet seeds from Mézières-lez-Cléry ( $306 \mu\text{g.g}^{-1}$ ; Table 5). Since pentacyclic triterpenes are reputed to be anti-microbial compounds, the exceptionally high concentration of miliacin could explain the high preservation potential of *P. miliaceum* seeds known since antiquity (Varro, De Re Rustica).

Our results (Table 5) indicate that miliacin was not present in the hull but only in the seed (albumen and embryo). Its absence from millet hull (i.e. glumes and lemma) contradicts previous results that erroneously reported it in millet hull due to incomplete separation between fruit and glumes/lemma before extraction (Jacob et al., 2008c). Its presumed presence in millet hull led us to propose eolian transport to the sediment after winnowing and threshing of millet seeds (Jacob et al., 2008c). In the light of the new results, and considering that seeds are the major miliacin contributing organ in *P. miliaceum*, a high level of miliacin in Lake le Bourget sediments could result from its transportation via consumption by people (or animals). A lower level could be interpreted as a geochemical background resulting from runoff from soils formerly cultivated for millet.

The low concentration in leaves and stems may be because the compound is synthesized in the leaves but then translocated to the seeds through the stems. We also found it in the roots of millet cultivated in the open field but not in the roots of plants grown in a controlled environment chamber (Table 6). At Mézières-lez-Cléry, we found a significant level in the soil in which *P. miliaceum* grew (see above), probably due to seeds falling onto the soil during years of cultivation (Bossard, unpublished results). In contrast, we did not detect any in a hydroponic solution on which millet was grown in controlled environment chambers. Therefore, roots of plants sampled in the open field were likely contaminated by miliacin already present in the soil (see above).

The presence of friedelin, germanicol,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin and glutinol in the leaves of *P. miliaceum* (Table 6) is consistent with findings for millet leaf wax (Tulloch, 1981). Tulloch (1981) did not detect miliacin,  $\beta$ -amyrin ME or  $\alpha$ -amyrin ME in leaf wax, in agreement with our findings, of little to none of them in tissue other than seeds. We found the distribution of friedelin to differ from that of miliacin since it was 10x more concentrated in leaves ( $111.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) than in seeds ( $11 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). The ratio of friedelin to miliacin reached 14.8 in leaves whereas it was only of 0.036 in the seeds of the samples collected from the Mézières-lez-Cléry field. Germanicol, similar in structure to miliacin, was more abundant than  $\beta$ - and  $\alpha$ -amyrins or glutinol in leaves, stems and seeds of *P. miliaceum* and was more abundant in leaves than in seeds;  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin and glutinol concentrations did not differ between seeds and leaves.

Tableau 6: Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of pentacyclic triterpenes in *Panicum miliaceum* (n.d., not detected).

Species	Variety	Origin	Organ	Sampling date	olean-18-en-3 $\beta$ -ol ME (miliacin)	olean-12-en-3 $\beta$ -ol ME (isosawamiletin)	urs-12-en-3 $\beta$ -ol ME	DA-Friedooleanan-3-one (friedelin)	olean-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -amyirin)	urs-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -amyirin)	olean-18-en-3 $\beta$ -ol (germanicol)	D:B-Friedo-olean-5-en-3 $\beta$ -ol (glutnol)
<i>Panicum miliaceum</i>	<i>var. sunrise</i>	Mézières-lez-Cléry	Leaves	2010	7.5	n.d.	n.d.	111.	2.6	7.1	30.5	2.2
	<i>var. sunrise</i>	Mézières-lez-Cléry	Roots	2010	23.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>var. sunrise</i>	Mézières-lez-Cléry	Seeds	2010	306	3.2	4.2	11	6.9	4.1	6.2	2.8
	<i>var. sunrise</i>	Mézières-lez-Cléry	Stems	2010	171	1.8	2.9	n.d.	7.2	5.3	8.3	n.d.
	<i>var. sunrise</i>	Mézières-lez-Cléry	Glume	2010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>var. sunrise</i>	Greenhouse / Bioemco*	Seeds	2011	424.5	4.5	5.7	41.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>var. sunrise</i>	Greenhouse / Bioemco*	Roots	2011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Black seeds (1)***</i>	St Hilaire la Forêt, France	Seeds	1990	399.1	n.d.	n.d.	17.1	n.d.	n.d.	0.9	n.d.
	<i>Black seeds (1)***</i>	St Hilaire la Forêt, France **	Seeds	2011	412.7	n.d.	n.d.	40.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Yellow seeds (2)***</i>	St Hilaire la Forêt, France	Seeds	1990	368.4	n.d.	n.d.	26.2	1.9	0.2	0.9	n.d.
	<i>Black seeds (3)***</i>	St Vincent sur Graon, France	Seeds	1991	448.4	n.d.	n.d.	12.3	n.d.	n.d.	1.6	n.d.
	<i>A (5) ***</i>	CAIRN	Seeds	1990	323.3	n.d.	n.d.	23.8	n.d.	n.d.	1.2	n.d.
	<i>B (6)***</i>	CAIRN	Seeds	1990	436.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>C1 (4) ***Small spiklets</i>	CAIRN	Seeds	1991	408.1	n.d.	n.d.	20.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>C2 (7)***</i>	CAIRN	Seeds	1992	476.0	n.d.	n.d.	21.6	n.d.	n.d.	0.5	n.d.
	-	Bougon, France	Seeds	2004	371.7	n.d.	n.d.	11.2	n.d.	n.d.	0.8	n.d.
	-	Aubigny, Le Baillargeau,	Seeds	2006	330.9	n.d.	n.d.	4.7	n.d.	n.d.	1.3	n.d.
	-	La Fembretière, France	Seeds	2006	301.6	n.d.	n.d.	13.8	n.d.	n.d.	1.0	n.d.
	-	Aubigny, La Livraie, France	Seeds	2006	296.6	n.d.	n.d.	5.5	n.d.	n.d.	1.3	n.d.

\* Seeds from Mézières-lez-Cléry were grown in a greenhouse at Bioemco.

\*\* Seeds from St Hilaire la Forêt were grown in a greenhouse at Bioemco.

\*\*\* See Poissonnier (1994).

## **b) Variation in miliacin and other PTMEs among *P. miliaceum* varieties**

Because the strains of *P. miliaceum* evidently differed from those cultivated during ancient times, we explored the variability in the distribution of miliacin and other PTMEs in several strains of *P. miliaceum*. The distributions of pentacyclic triterpenes in seeds of *P. miliaceum* var. sunrise collected from the open field were similar to those of the same variety cultivated in controlled-environment chambers and to those of all the *P. miliaceum* taxa (Table 1). Miliacin was, by far, the most abundant pentacyclic triterpene in any sample, ranging from 296 to 476  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . This accounts not only for the variety presently cultivated in an open field but also for the same variety cultivated in a climate chamber or for the ruderal varieties thought to be derived from millet cultivated in ancient times (Poissonnier, 1994). Therefore, the very high abundance of miliacin in *P. miliaceum* did not appear to be dependent on cultivation conditions or affected by the strain/degree of selection. Although a similar concentration of miliacin was found in all *P. miliaceum* seed samples, some of the other pentacyclic triterpene MEs ( $\beta$ -amyrin ME and  $\alpha$ -amyrin ME) were only detected in the sunrise variety and hardly reached 1% of miliacin concentration. Considering this variability within *P. miliaceum* varieties, we cannot support the conclusion by Lu et al. (2009) that millet species (i.e. foxtail and broomcorn millet) can be distinguished on the basis of their respective abundance of miliacin,  $\beta$ -amyrin ME and  $\alpha$ -amyrin ME. In addition, chemical and geochemical transformations could slightly affect the proportions of  $\Delta^{12}$  and  $\Delta^{18}$  oleanene-type pentacyclic triterpenes (Rullkötter et al., 1994), reinforcing the idea that caution must be taken when interpreting subtle differences in the proportion of these compounds (Tableau 6). The second most abundant pentacyclic triterpene was friedelin, the concentration of which varied from 5 to 40  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Scarce data for other compounds could result from detection limits or to the size of seed, which could be related to maturity at harvest (Hunt et al., 2011).

## **c) Miliacin and other pentacyclic triterpenes in *Panicum* spp.**

**Miliacin** We explored whether or not the distribution of miliacin and other compounds found in *P. miliaceum* is a common trait for other species of the *Panicum* genus. Miliacin was detected in each *Panicum* species (Table 6), even those for which we had a very small amount of seeds. Seed sample size also had no apparent effect on the detection of other compounds. For example,  $\beta$ -amyrin ME,  $\alpha$ -amyrin ME and friedelin were detected in *P. humile* but were absent from *P. halii*, for which we extracted 10x the weight of *P. humile*.

The widespread occurrence of miliacin among our *Panicum* species is in agreement with the report of its occurrence in *P. dichotomiflorum* (in culms and blades; Ohmoto et al., 1970b) and implies that it is very common in the *Panicum* genus. Although the fraction containing miliacin was not explored and his study focussed on leaf waxes, Tulloch (1981) found germanicol in *P. texanum*. Considering the genetic relationship between miliacin and germanicol and that we always detected germanicol together with miliacin (Tables 5 and 6), miliacin is probably present in

*P. texanum*. Concerning other triterpenoids,  $\beta$ -amyirin ME and  $\alpha$ -amyirin ME were found in six and five species respectively among the eleven analyzed (Table 6). As for *P. miliaceum*, some *Panicum* species (*P. capillare*, *P. coloratum*, *P. kalahareense*, *P. hali*, *P. aldabrense*, *P. laxum* and *P. pseudowoeltzkowii*) were characterized by the dominance or exclusive presence of miliacin among the PTMEs. Other species (*P. nervatum*, *P. phragmitoides* and *P. turgidum*) displayed significant proportions of  $\beta$ -amyirin ME and  $\alpha$ -amyirin ME. Friedelin was detected only in two species (*P. humile* and *P. phragmitoides*) and  $\beta$ -amyirin,  $\alpha$ -amyirin, germanicol and glutinol were rarely found, probably due to detection limit. Considering the much lower concentration of miliacin in *Panicum* spp. other than *P. miliaceum*, and the much smaller contribution of seeds from these species to their biomass, a significant input of miliacin from other *Panicum* species (that are not crops) is unlikely.

**Tableau 7 : Inventory of pentacyclic triterpenes in *Panicum*, *Pennisetum* and *Setaria* species. X indicates that the compound was detected in the extract.**

Genus	Species	Number of extracted seeds	Extracted seeds weight (mg)	olean-18-en-3 $\beta$ -ol ME (miliacin)	olean-12-en-3 $\beta$ -ol ME (Isosawamilletin)	urs-12-en-3 $\beta$ -ol ME	DA-Friedooleanan-3-one (friedelin)	olean-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -amyrin)	urs-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -amyrin)	olean-18-en-3 $\beta$ -ol (germanicol)	D:B-Friedo-olean-5-en-3 $\beta$ -ol (glutinol)
<i>Panicum</i>	<i>capilare</i>	50	67	X						X	X
	<i>coloratum</i>	37	2	X							
	<i>humile</i>	39	3	X	X	X	X				
	<i>kalaharensis</i>	50	89	X	X			X	X		
	<i>nervatum</i>	50	8	X	X	X					
	<i>phragmitoides</i>	50	48	X	X	X	X		X		X
	<i>turgidum</i>	50	101	X	X	X					
	<i>halii</i>	49	52	X							
	<i>aldabrensis</i>	50	9	X	X	X				X	
	<i>laxum</i>	50	5	X							
	<i>pseudowoeltzii</i> <i>kowii</i>	49	12	X							
<i>Pennisetum</i>	<i>divisum</i>	50	101								
	<i>hordeoides</i>	50	4	X		X					
	<i>polystachion</i>	50	18	X						X	
	<i>sieberianum</i>	50	158			X					
	<i>unisetum</i>	49	13								
<i>Setaria</i>	<i>italica</i> (N=3)		1056			X	X	X	X		



#### **d) Miliacin and other pentacyclic triterpenes in other *Poaceae***

Ohmoto et al. (1970a) concluded that miliacin was common throughout the *Poaceae* after detecting it in *M. vimineum*, *P. dilatatum* (culms and blades) and *E. ferruginea* (culms and blades). It was also found in 6 out of > 20 *Chionochloa* spp. (Connor and Purdie, 1976). In the *Pennisetum* genus, it was detected only in *P. hordeoides* (associated with  $\beta$ -amyirin and  $\alpha$ -amyirin MEs) and *P. polystachion* (where it was the sole PTME), but not *P. divisum*, *P. sieberianum*, or *P. unisetum*. Similarly, Ohmoto et al. (1970a) did not detect it in *P. alopecuroides* seeds. Therefore, and in contrast to the *Panicum* genus where it is present in every species we analyzed, miliacin is not ubiquitous in *Pennisetum* or *Chionochloa* species.

It was not detected in any of the two varieties of *S. italica* we analyzed, despite the fact that we extracted large samples of seeds. Our results are consistent with those of Ohmoto et al. (1970a), who did not detect it in seeds of *S. chondrachne*, *S. faberi* and *S. italica*, but disagree with its detection in *S. italica* by Lu et al. (2009). Information about seed sample weight was not given in the last study and perhaps Lu et al. (2009) used even larger samples than ours. Peaks attributed to miliacin peaks on their chromatograms are of low amplitude for *S. italica* and off the chart for *P. miliaceum*, suggesting at most, a much lower concentration in the former species than in the latter, or, more likely, contamination of the *S. italica* sample by *P. miliaceum* sample (memory effect). *Pennisetum* and *Panicum* are biochemically (Giussani et al., 2001) and genetically (Benetzen et al., 2012) more similar to one another than they are to *Setaria*, so this could explain why miliacin is present in both *Pennisetum* and *Panicum* spp. but absent from *Setaria* spp.

#### **e) Miliacin in *C. olivaceum***

The rice seeds we used as a cultivation medium for *C. olivaceum* contained several phytosterols, such as campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol (in agreement with Nasu et al., 2000; Macias et al., 2006) but no pentacyclic triterpene MEs (PTMEs). We know of no study that found PTMEs in rice seeds, but arundoin [fern-9(11)-en-3 $\beta$ -ol ME] and cylindrin [arbor-9(11)-en-3 $\beta$ -ol ME] have been detected in rice leaves (Ohmoto et al., 1970b). We did not detect any miliacin in the rice on which *C. olivaceum* developed, but ergosterol, which is known to be synthesized de novo by fungi (Fryberg et al., 1973; Alcazar-Fuoli et al., 2008) and is therefore classically used as a fungal biomarker (Grant and West, 1986), was detected in addition to the sterols found in the control rice. Neither miliacin nor any other pentacyclic triterpene was detected in our extract of *C. olivaceum*. This is consistent with current knowledge of C-3 oxygenated pentacyclic triterpenes, which are exclusively reported in higher plants (i.e. Das and Mahato, 1983; Connolly and Hill, 1989, 1996, 2001, 2007; Mahato et al., 1992; Connolly et al., 1994a, 1994b; Mahato and Sen, 1997; Xu et al., 2004) due to distinct oxidosqualene cyclases between fungi and plants (i.e. Abe et al., 1993). The strong contrast between the results of Smetanina et al. (2001), who extracted sufficient amounts of miliacin from their samples (> 12 mg) to perform NMR identification, and the absence

of any miliacin in our samples cannot be explained by the absence of yeast extract in our experiment. To our knowledge, the results from Smetanina et al. (2001) constitute the sole report on a pentacyclic triterpene in a fungus. We know of no other efforts to reproduce their results except ours and we did not find miliacin or any other pentacyclic triterpene in *C. olivaceum*.

## **6. Guidelines for using sedimentary miliacin as a tracer of *P. miliaceum***

Based on previous studies, we hypothesize that, where sedimentary archives of miliacin are found in conjunction with a high concentration of other PTMEs (e.g. for a Brazilian lake, Jacob et al., 2005; for the Niger Delta, Oyo-Ita et al., 2010), the compound cannot be used as a biomarker for *P. miliaceum*. In contrast, miliacin was the sole detectable PTME in the sediments from lake Le Bourget (Jacob et al., 2008a,b, 2009) and lakes Ledro and Paladru (Simonneau et al., 2013), and in Ukrainian paleosols thought to have been cultivated for *P. miliaceum* (Motuzaite-Matuzeviciute et al., in press). In conjunction with other evidence, the presence of miliacin in these cases was interpreted as a tracer for the cultivation of *P. miliaceum* in the catchment area. In order to determine whether or not miliacin also predominates over other PTMEs found in *P. miliaceum* in soil, we first analyzed seeds from 76 millet plants collected in the field of Mézières-lez-Cléry. We found that miliacin constituted on average 94.9% of the three PTMEs (max. 100; min. 86.5),  $\alpha$ -amyrin ME 4.4% (max. 10.5; min. 0) and  $\beta$ -amyrin ME 0.7% (max. 7.2; min. 0). In soil (20 top soils analyzed), PTMEs also consisted mainly of miliacin (avg. 97.4%, max. 100%; min. 85%),  $\alpha$ -amyrin ME (avg. 0.4%, max. 5.4%; min. 0%) and  $\beta$ -amyrin ME (avg. 2.2%, max. 15%; min. 0%). Therefore, the overwhelming predominance of miliacin over other minor PTMEs in *P. miliaceum* seeds is, at least, preserved during the transfer to soil. Further work is underway to test whether this assertion is robust during the transfer to aquatic sedimentary archives. C-3 oxygenated pentacyclic triterpenes are reputed to undergo double bond migration during early diagenesis (Rullkötter et al., 1994). Depending on the physical conditions that prevail during transportation from the plant source to the soil or sediment archive, one can expect minor to moderate changes in the relative proportions of miliacin and, for example,  $\beta$ -amyrin ME. Miliacin can therefore be synthesized by a large array of plants but only *P. miliaceum* produces a large amount relative to other PTMEs. Therefore, miliacin should only be used as a tracer of *P. miliaceum* when it constitutes the exclusive or, at least, predominant PTME in a geological archive. Of importance is the large biomass constituted by cultivated millet that, added to the elevated concentration of miliacin in the seeds can explain why miliacin from *P. miliaceum* is detectable in sediments, whereas miliacin and other PTMEs from weeds or grass of minor importance might not reach the threshold for GC–MS detection. As for any molecular biomarker, future work involving miliacin should take into account the geological, ecological and archaeological context in order to ascertain the relationship between soil or sedimentary miliacin and cultivated *P. miliaceum*.

## 7. Conclusion

The exploration of several varieties of *P. miliaceum* for miliacin and other pentacyclic triterpenes reveals that miliacin is very abundant (much more than any other pentacyclic triterpene) in the seeds of this plant, with a similar concentration regardless of the variety considered (cultivated or ruderal). High amounts of miliacin, largely exceeding other PTMEs, were also noted for soils cultivated for was also found in all species belonging to the *Panicum* genus, either as the unique PTME or accompanied by low to significant levels of  $\beta$ -amyrin ME and  $\alpha$ -amyrin ME. It was only sparsely detected in *Pennisetum* species and was not found in two varieties of *S. italica* we analyzed. It can therefore help distinguish between the two millets. Its absence from *C. olivaceum* strongly contradicts the results of the one other study on this topic but is consistent with the global scheme of the C-3 pentacyclic triterpene distribution in organisms. Our results also provide guidelines for interpreting miliacin which, when found in abundance and as the sole/dominant PTME in soils and sediments, can confidently be used as a tracer for unravelling the history of millet cultivation.

## 8. Acknowledgments

The work is a part of the PalHydroMil project, supported by Agence Nationale de la Recherche grant ANR-2010-JCJC-607-01, the PaléoChamps project (AIR Archéométrie, CNRS/INSU) and NSF project # BCS0551668. We thank the Kew Seed Database, H. Hunt, M.K. Jones and X. Liu (McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge, UK) and J. Dupont (Muséum National d'Histoire Naturelle) who provided *Panicum* and *Pennisetum* seeds, *P. miliaceum* seeds from China and the *C. olivaceum* strain, respectively. N.B. benefitted from a PhD grant provided by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (Action Thématique Prioritaire, 2009-2012). V.J.T. was hosted at ISTO under the auspices of LE STUDIUM<sup>2</sup> (Loire Valley Institute for Advanced Studies). T. Bariac, P. Biron and P. Richard are acknowledged for greenhouse cultivation of *P. miliaceum* (BioEMCo - UMR 7618 CNRS, ENS-Ulm, ENSCP, INRA, AgroParisTech, UPMC - INRA-AgroParisTech, Bâtiment EGER, 78850 Thiverval-Grignon, France). We are also grateful to J. Volkman and an anonymous reviewer for constructive comments.

## B. Compléments

## 1. Biotransformation de triterpènes par *C. olivaceum*

Dans la partie précédente, on a pu voir que *C. olivaceum* synthétisait des stérols, dont l'ergostérol, stérol pouvant provenir de la biotransformation de stérols existant dans le riz (Nasu et al., 2000 ; Macias et al., 2006). J'ai entrepris de cultiver *Chaetomium olivaceum* en présence de triterpènes pentacycliques afin de faciliter la biotransformation éventuelle de divers composés en miliacine. *C. olivaceum* a été cultivé sur billes de silice avec un milieu nutritif réarrangé suivant trois protocoles (Janeczko et al., 2009 ; Jiang et al., 2010 ; Yan et al., 2012) auquel étaient ajoutés différents standards (Figure 41).

$\alpha$ -Amyrine		$\beta$ -Amyrenil Acétate		Arundoïne	
$\beta$ -Amyrine		Acide Oléanolique		Friedéline	
$\beta$ -Amyrénone		Acide Ursolique		Miliacine	
$\beta$ -Amyrine Méthylether		Cylindrine			

**Figure 41 : Standards injectés dans le milieu de culture de *Chaetomium olivaceum*.**

Il n'est rien ressorti de concluant de ces cultures. Le développement de *C. olivaceum* a été quasi nul, y compris pour le contrôle. Outre le fait que le milieu n'était peut-être pas totalement adapté (bille de silice et trop grande hauteur d'eau), il se pourrait aussi que l'ajout du solvant utilisé

pour diluer les poudres et apporté avec les triterpènes ait empêché le développement du champignon. Des expériences ont montré que le taraxérol et le lupéol sont toxiques pour les insectes et induisent des perturbations osmotiques chez *Hordeum vulgare* L. (Heinzen and Moyna, 1993). La toxicité de ces composés serait due à une inhibition de la formation des chaînes alkyles des membranes phospholipidiques (Rodríguez, et al., 1997).

## 2. Culture de *C. olivaceum* sur des graines de millet

Une dernière culture de *C. olivaceum* a été réalisée sur des graines de millet. Cette fois, on a pu observer le développement d'un champignon (Figure 42) qui, d'après les observations microscopiques (Figure 43), n'est pas *C. olivaceum*.

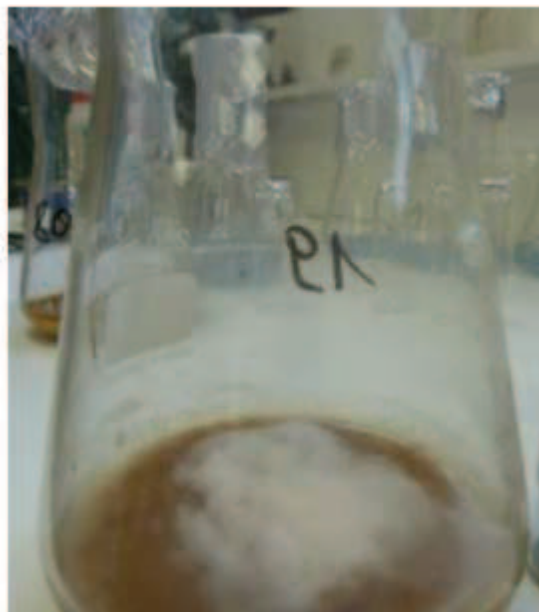
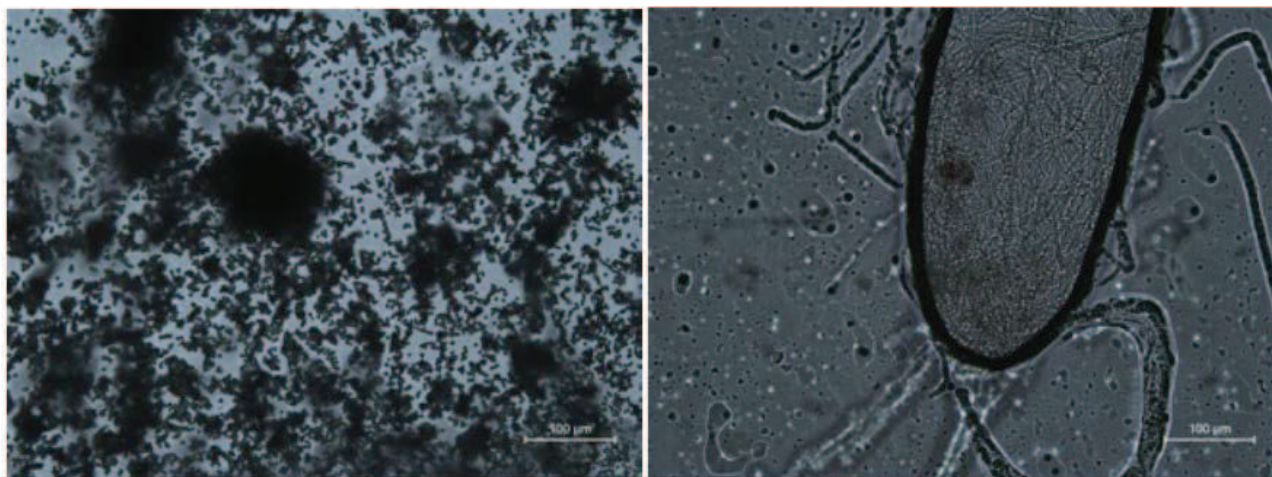


Figure 42 : Développement d'un champignon sur un milieu de culture constitué de graines de millet.





**Figure 43 : Observations au microscope optique de *Chaetomium* à gauche et du champignon s'étant développé sur les graines de millet à droite.**

La miliacine comme les autres triterpènes pentacycliques est reconnue comme ayant des propriétés antifongiques (Smetanina et al., 2001). Il est donc intéressant de voir que la miliacine inhiberait la prolifération de *Chaetomium olivaceum* tout en permettant la prolifération d'un autre champignon. Cela nous conforte dans le fait de penser que *Chaetomium olivaceum* ne peut biotransformer un quelconque composé en miliacine, puisqu'il pourrait lui-même être sensible à la miliacine. La deuxième hypothèse serait que *Chaetomium olivaceum* ne soit pas assez compétitif par rapport à l'autre champignon pour proliférer sur un milieu riche en miliacine. Le deuxième champignon proviendrait des graines de millet puisqu'il est connu que les céréales sont porteuses de nombreux champignons (Saville, 1984 ; Gregori et al., 2013).

## Synthèse: Spécificité de la miliacine

- La miliacine est présente dans **toutes** les variétés de *Panicum miliaceum* analysées, et dans des concentrations du même ordre de grandeur.

- La miliacine est présente dans toutes les espèces de *Panicum* analysées, selon des concentrations qui peuvent varier. La miliacine reste cependant synthétisée de façon prédominante par *Panicum miliaceum*, *P. capillare*, *P. kalaharensense*, *P. phragmitoides* et *P. turgidum* qui peuvent représenter une biomasse importante si l'on considère le poids des graines.

- La miliacine n'a pas été détectée dans les 3 variétés de *Setaria italica* analysées.

- La miliacine est détectée dans quelques espèces de *Pennisetum* analysées, mais n'est pas présente dans toutes. Ce genre est phylogénétiquement intermédiaire entre les genres *Panicum* et *Setaria*.

- La miliacine n'est pas détectée dans *Chaetomium olivaceum* ou dans son milieu de culture, initialement dépourvu de miliacine.

- Quantitativement, la miliacine est hyper-concentrée dans les graines de *Panicum miliaceum* comparées aux graines des autres plantes analysées.

- La miliacine, lorsqu'elle est donc retrouvée en abondance dans les sédiments lacustres, semble être caractéristique de la présence de *Panicum miliaceum* sur le bassin versant.

Nous venons de montrer que la miliacine, lorsqu'elle était détectée dans une archive sédimentaire, pouvait vraisemblablement être utilisée comme marqueur de plantes du genre *Panicum*, et en particulier de *P. miliaceum*.

La spécificité de la miliacine étant confirmée, au moins en ce qui concerne les sédiments du Lac du Bourget, l'argument selon lequel la mesure du  $\delta D$  sur cette molécule permettrait de s'affranchir des effets de mélange liés à différentes sources est étayé, ce qui renforce l'intérêt du  $\delta D$  de cette molécule pour reconstituer les conditions paléohydrologiques. Cependant, avant d'envisager comprendre les facteurs influençant le  $\delta D$  de la miliacine par calibration, j'ai voulu vérifier que la miliacine enregistrait les conditions hydrologiques locales, et estimer les limites d'utilisation d'un tel outil.

## C. Pertinence spatiale du $\delta D$ de la miliacine dans *Panicum miliaceum*

Cette partie constitue un article publié en 2011 : Bossard, N., Jacob, J., Le Milbeau, C., Lallier-Vergès, E., Terwilliger, V.J., Boscardin, R. Variation in  $\delta D$  values of a single, species-specific molecular biomarker: a study of miliacin throughout a field of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. May 2011, Vol. 25, pp 1-9.

### 1. Résumé en français

Le  $\delta D$  de molécules d'origine végétale préservées dans les sédiments lacustres est de plus en plus utilisé dans les analyses paléoclimatiques. Ces biomarqueurs sont en effet capables d'enregistrer les conditions climatiques qui prévalaient lors de leur synthèse. La justesse de l'impact du climat sur ces valeurs pourrait être mieux contrainte si la variabilité des valeurs  $\delta D$  à l'échelle d'un bassin versant était étudiée.

Nous avons mesuré les valeurs du  $\delta D$  de la miliacine (olean-18-en-3 $\beta$ -ol méthyl éther) extraites de graines de millet, collectées sur 21 sites, et réparties dans un champ avec des hétérogénéités de teneurs en matière organique du sol visibles à l'œil nu. L'utilisation d'un biomarqueur moléculaire unique extrait d'une seule espèce végétale élimine la possibilité d'une variabilité interspécifique.

Les valeurs  $\delta D$  diffèrent, à l'échelle des plants, par plus de 50‰ V-SMOW, et à l'échelle des sites, par un maximum de 30‰ V-SMOW. Les différences des valeurs de  $\delta D$  pour la miliacine des plantes d'un même site peuvent être aussi importantes que la différence inter-sites, ce qui nous laisse à penser que la teneur en carbone organique du sol n'est pas le facteur qui contrôle cette variabilité. Cette hypothèse est confirmée par le fait que les valeurs  $\delta D$  ne sont pas reliées à des facteurs tels que la hauteur du plant, le poids des graines ou la concentration en miliacine dans les graines, qui peuvent être affectées également par la qualité du sol. La valeur  $\delta D$  miliacine moyenne est représentative de l'aire échantillonnée du fait de la distribution homogène des valeurs ( $p < 0.05$ ). Ainsi, la probabilité que la valeur  $\delta D$  des molécules retrouvées dans les sédiments lacustres représente la moyenne des valeurs  $\delta D$  du bassin versant, et par conséquent l'information climatique valide à l'échelle de la parcelle, et par extension du bassin versant, est grande.

### 2. Abstract

Compound-specific  $\delta D$  analyses of land plant-derived biomarkers preserved in lake sediments are gaining increasing interest in paleoclimatic studies because of their potential to record essential information on the climatic conditions that prevailed at the time of their synthesis. The accuracy of inferences about climate from these analyses could be better constrained with more study of the variability in the  $\delta D$  values of possible inputs at catchment scales. We measured



the  $\delta D$  values of miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether) extracted from the seeds of millet plants collected in 21 stands spatially distributed in a field with visually heterogeneous soil organic matter contents. The use of a single molecular biomarker extracted from a single plant species eliminates the possibility of variability caused by differences in plant type. The  $\delta D$  values differed between plants by as much as 50‰ and the average  $\delta D$  values per stand differed from one another by a maximum of 30‰. Thus, the  $\delta D$  values of a single, species-specific biomarker can vary markedly among plants even within a similar climate. Differences in  $\delta D$  values within stands could be as high as between stands, suggesting that the  $\delta D$  values are not related to macroscale heterogeneities in soil organic matter content. In addition,  $\delta D$  values were unrelated to factors indicative of differences in environment such as plant height, seed weight or miliacin concentration. The average miliacin  $\delta D$  value was representative of the area sampled, however, since it was normally distributed ( $p < 0.05$ ).

### 3. Introduction

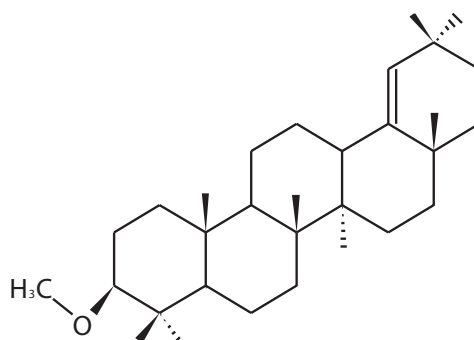
Compound-specific stable hydrogen isotope analyses are receiving increasing attention for their potential to record paleoclimatic conditions. The rationale for using this technique is that the hydrogen isotopic composition ( $\delta D$ ) of individual molecules records information on the climatic conditions at the time of their biosynthesis (Sessions et al., 1999; Sauer et al., 2001; Huang et al., 2002; Gleixner and Mugler, 2007). Once released in the environment, molecules synthesised by a large array of producers in the catchment can then be transported to lake sediments where, if conditions remain favourable, they can be preserved for millions of years (Yang and Huang, 2003). The  $\delta D$  values of molecules that accumulated through time in sediments can thus provide integrative information about past climate changes. Nonetheless, the accuracy of these inferences requires an understanding of the quantitative relationships between compound-specific  $\delta D$  values and the controlling environmental factors.

An effective means of quantifying relationships between the  $\delta D$  of individual molecules and environmental factors is by calibration over natural or controlled environmental gradients. Calibration studies have demonstrated that the  $\delta D$  values of lipids from higher plants are primarily controlled by the  $\delta D$  values of the sources of the hydrogen used for their synthesis, normally meteoric waters, which, in turn, are climatically controlled (Dansgaard, 1964). Nonetheless, other factors can affect the  $\delta D$  values of lipid compounds from higher plants. Unlike submerged, aquatic photosynthesizing organisms, the hydrogen in water that land plants use to synthesize organic compounds will have been exposed to fractionations from evaporation in the soil and from transpiration. Although the precise effects of evaporation and transpiration on the  $\delta D$  values of the source water for lipid synthesis in higher plants are presently contentious, their associated fractionations may lead to a 30‰ enrichment in deuterium in higher plant lipids over those of phytoplankton (Sachse et al., 2004; Feakins and Sessions, 2010; McInerney et al., 2011). Soil properties affect the vertical distribution of the soil water  $\delta D$  values and thus the  $\delta D$  values of water

absorbed by plants, depending on their rooting system (Barnes and Turner, 1998). The type of vegetation (trees/herbs for example) not only controls the depth of root penetration but also the intensity of soil water evaporation and leaf water transpiration (Hou et al., 2007). Depending on biosynthetic (isoprenoids/acetogenic lipids) and possibly photosynthetic pathways ( $C_3/C_4/CAM$ ), hydrogen will be subjected to different fractionation during enzymatic processes that, in turn, will lead to varying  $\delta D$  of the biomolecules formed (Sessions et al., 1999; Sauer et al., 2001; Chikaraishi et al., 2004; Smith and Freeman, 2006). Finally, water use efficiency as well as potential variations of water source  $\delta D$  with time may also have impacts on the  $\delta D$  of higher plant lipids (Hou et al., 2007b; Sessions, 2006).

The aforementioned potential sources of variability could lead to a considerable range of  $\delta D$  values contributing to the pool of plant-derived lipids preserved in lake sediments. Part of this variability could be due to environmental differences (soil properties for example) among the source areas of plants. Another source of variability could arise from differences in  $\delta D$  values of the same lipid from different plant types within the same source area. The few studies of possible plant sources to lake sediments within a catchment suggest that the differences in  $\delta D$  values of *n*-alkyl lipids can be large among different plant types (Hou et al., 2007; Krull et al., 2006; Liu and Huang, 2005; Liu and Huang, 2008). The potential of sediments to accumulate *n*-alkyl lipids with a large spectrum of  $\delta D$  values raises the question of the confidence that can be placed on paleoclimatic records based on compound-specific  $\delta D$  values.

A way to discriminate between environmental and biological factors affecting the  $\delta D$  of plant lipids and to avoid the bias induced by plant types is to analyze molecules that are specific to certain plant taxa. Most of the  $\delta D$  work on land plant derived lipids has been restricted to *n*-acids, *n*-alkanes and sterols that are common across most taxa. We have detected, in tropical lake sediments, pentacyclic triterpene methyl ethers (PTME) derived mainly from Gramineae (Jacob et al., 2005). One of these PTMEs, miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether; Figure 44), was also detected in the sediments of Lake le Bourget where, at least within the French Alps, it has a unique source plant: millet (*Panicum miliaceum*) (Jacob et al., 2008a; Jacob et al., 2008b).



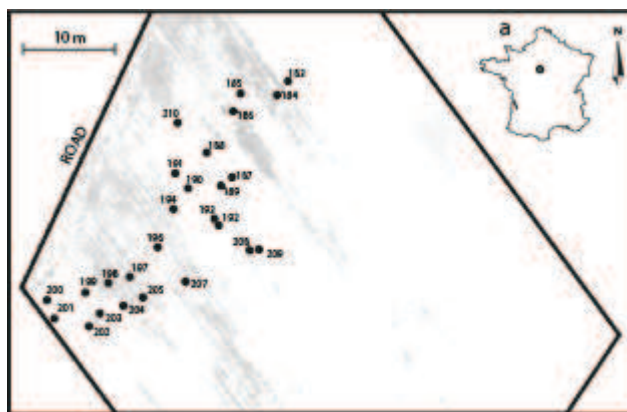
**Figure 44 : Structure of miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol methyl ether).**

The objective of the research reported herein is to examine the variability in the  $\delta D$  values of miliacin extracted from millet seeds collected randomly in a field, which constitutes an intermediate scale between a single plant and an entire lake catchment. We address the specific question of variability in  $\delta D$  with environmental change by restricting the study to a single compound from a single species. This allows us to exclusively examine the impacts of local environmental parameters. To the best of our knowledge, this is the first paper to evaluate environmental variation in  $\delta D$  of a land plant derived lipid that, if extracted from sediments, would not be confounded by variation in plant type. Our findings will be readily applicable to the use of miliacin  $\delta D$  in sediments for paleoclimate studies but are also thought to be extendable to other specific compounds.

## **4. Experimental**

### **a) Sample collection**

Samples of *P. miliaceum* (var. Sunrise) were collected during August 2009 at harvest time from a field in Mézières-lez-Cléry, near Orléans, France (47°50'15", 1°48'20"E and ca. 100m above sea level). The mean  $\delta D$  of precipitation was  $-41.1 \pm 7.2\text{‰}$  during the 1996-2005 time period at the closest Global Network for Isotopes in Precipitation (GNIP) monitoring station (Orléans-La-Source). This field was chosen considering the variability in soil properties as illustrated by different shades of grey on aerial picture (Figure 45) that indicate contents of organic matter. The heights of plants of *P. miliaceum* growing in the field were measured from the first node up to the top of the main panicle. Plant heights range from ca. 30 cm up to 120 cm, with higher plants developed on more organic soils, as determined by field measurements. 26 stands representative (numbered from 183 to 210) of the various contexts (heights of the millet plants and soil color) were selected in the field. From 1 to 5 plants (3 in most cases for a total of 61) were taken at each stand at less than 30cm apart. The whole plants were sampled and dried in an oven at 35°C for 48 h. The weight of the main panicle was determined after drying.



**Figure 45 : Location of *P. miliaceum* field, heterogeneity of soil properties on aerial picture (grey scale) and location of samples.**

### **b) Miliacin extraction and purification**

For each plant sample, twenty seeds of the main panicle were ground to powder and weighed. These twenty seeds provide a sufficient amount of miliacin for determination of  $\delta D$  values. We analyzed two sets of twenty seeds from a single panicle of each plant and we observed no significant differences either in millet seed weight, miliacin concentration or miliacin  $\delta D$  values between sets. Lipids were ultrasonically extracted three times with organic solvents (DCM:isopropanol 2:1), and the lipids extracts were then combined. The total extract was then separated into neutral, acidic and polar fractions by ion exchange column on aminopropyl-bonded silica. The neutral lipid fraction was eluted with DCM:isopropanol 2:1 and then dried under nitrogen. Miliacin (Figure 44) was purified from the neutral fraction by flash chromatography on activated silica by using the following solvents of increasing polarity. After the elution of aliphatic and aromatic hydrocarbons, miliacin was collected in fractions eluted with 2mL hexane:toluene (1:1) and 2mL hexane:ethyl acetate (19:1). Miliacin-containing fractions were then combined, dried under nitrogen and stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  until analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography-isotope ratio Mass Spectrometry (GC-irMS).  $5\alpha$ -cholestane was added prior to analysis by GC-MS for quantification purposes.

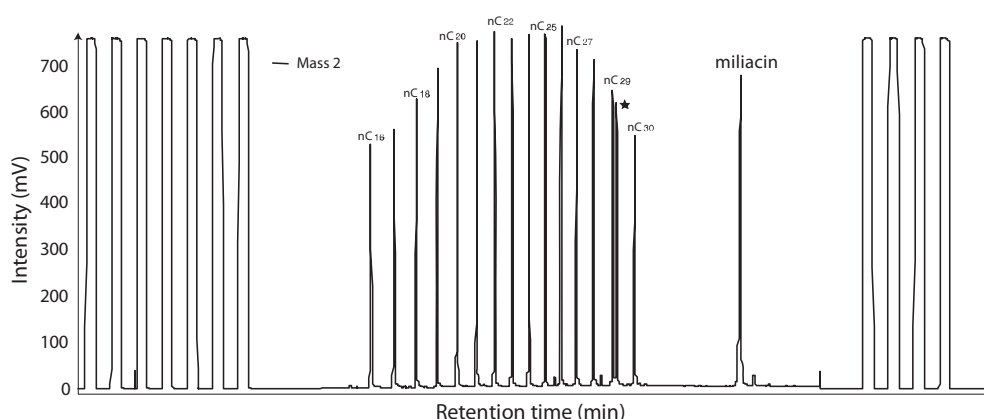
### **c) GC-MS analyses**

Miliacin contents and purity were assessed by GC-MS on a TRACE gas chromatograph coupled to a Polaris GCQ mass spectrometer (ThermoFinnigan, Bremen) according to previously described methods (Jacob et al., 2005). The gas chromatograph was fitted with an Rtx-5 MS capillary column (5m column guard, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). The gas chromatograph operating conditions were: temperature held at  $40^{\circ}\text{C}$  for 1 min, then increased from 40 to  $300^{\circ}\text{C}$  at  $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ , with final isothermal hold at  $300^{\circ}\text{C}$  over 30min. The sample was dissolved in toluene and injected splitless in a  $2\mu\text{L}$  volume, with the injector temperature set at  $280^{\circ}\text{C}$ . The carrier gas was Helium and the flow was set at  $1.4\text{mL}.\text{min}^{-1}$ . The mass spectrometer

was operated in the electron ionisation (EI) mode at 70eV ionization energy and scanned from 50 to 650 Da.

#### d) GC-irMS analyses

Miliacin  $\delta D$  values were determined by using a Trace gas chromatograph equipped with a Triplus autosampler coupled to a DeltaV Advantage isotope ratio mass spectrometer through a GC-Isolink pyrolysis interface and a ConFlo IV dilution system (ThermoScientific, Bremen). Chromatographic conditions were the same as those used in GC-MS, except that the GC column (J&W DB5, 30m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness) was slightly different. 1  $\mu$ L of miliacin dissolved in toluene was co-injected with an internal standard constituted by 1  $\mu$ L of a mixture of *n*-alkanes (*n*-C<sub>16</sub> to *n*-C<sub>30</sub>) with  $\delta D$  values ranging from -46.3 to -242.6‰ determined offline (Arndt Schimmelmann, Indiana University, Bloomington, USA). Due to high miliacin purity, no significant coelution of other compounds with *n*-alkanes was observed (Figure 46). Data were then normalized to the V-SMOW isotopic scale by using the  $\delta D$  of the *n*-C<sub>25</sub> and *n*-C<sub>27</sub> alkanes as reference (Sessions et al., 1990). All miliacin  $\delta D$  values are reported in‰ units relative to the V-SMOW scale.



**Figure 46 :** Chromatogram obtained by GC-irMS illustrating the distribution of miliacin and of a series of *n*-alkane standards (*n*-C<sub>16</sub>-*n*-C<sub>30</sub>) with  $\delta D$  values measured offline (acquired from Arndt Schimmelmann, Indiana University, Bloomington, USA) used for normalising miliacin  $\delta D$  values. \* indicates the 5 $\alpha$ -cholestane, used as quantitation standard.

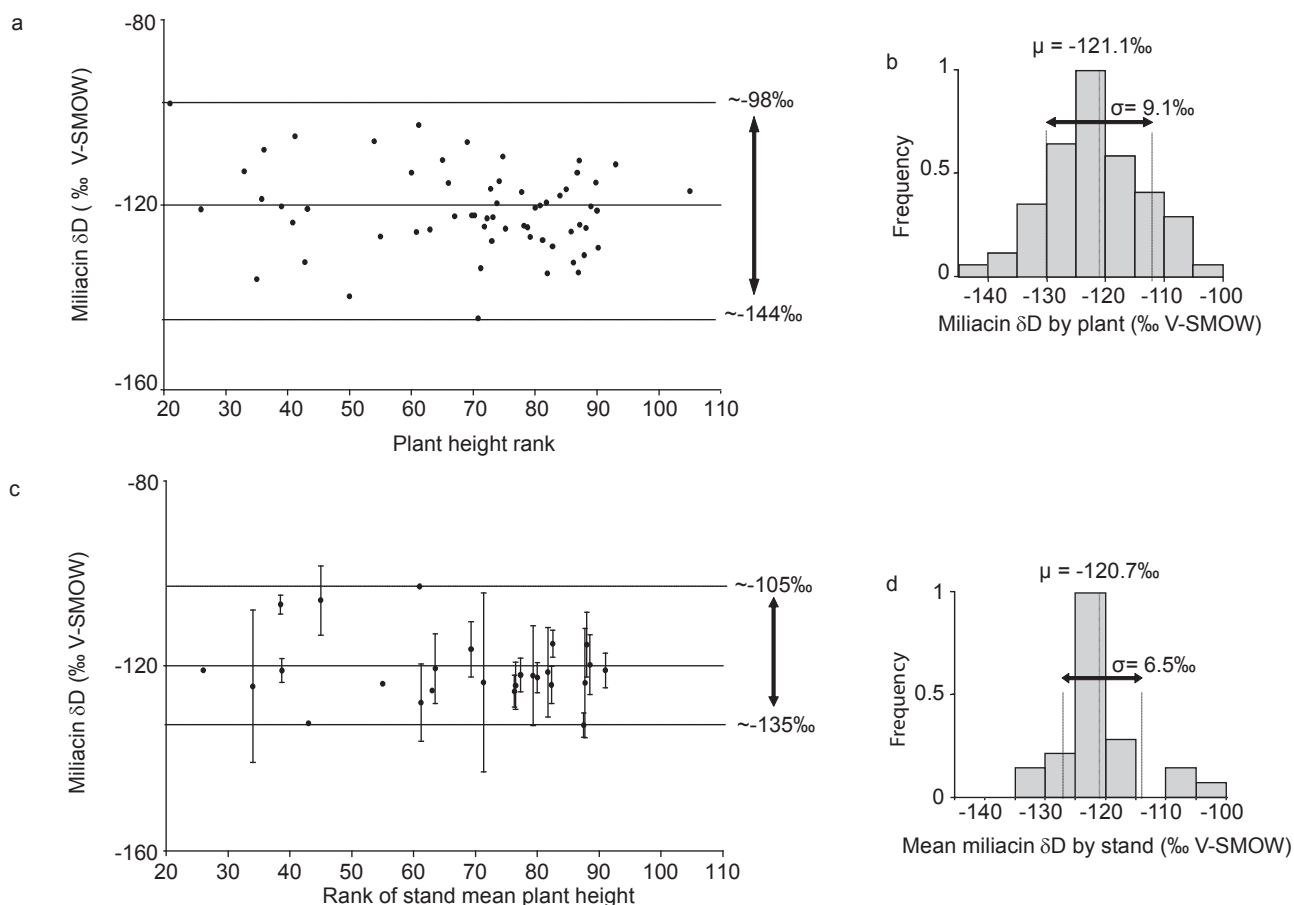
The 13 remaining *n*-alkanes were used for accuracy assessment, with the exception of the *n*-C<sub>29</sub> alkane that co-eluted with 5 $\alpha$ -cholestane (Figure 46). Each sample was randomly (i.e. not one after the other and not in logical order in the sequence of injection) injected at least 3 times. When necessary, supplementary injections were performed and aberrant values were not taken into account by using a Dixon test ( $p < 0.05$ ). The mean precision of miliacin  $\delta D$  values was 5.9‰ (from 0.3 to 12.0‰), i.e. within common precision ranges reported for natural samples (Sessions, 2006; Chikaraishi and Narakoa, 2005; M $\ddot{u}$ gler et al., 2008). The *n*-alkanes mixture was analysed every nine injections, as external standard. The overall precision for the *n*-alkane standard

(injected with and without sample) is around 3‰ ( $1\sigma$ ,  $n=361$ ), with no notable difference between internal and external standards, which suggests no significant coelution (Sessions et al., 1990). Measured *n*-alkanes  $\delta D$  values are in good agreement with those measured offline, except for a significant drift at elevated  $\delta D$  values. The best match between offline and online  $\delta D$  values for *n*-alkanes is between -240 and -70‰. The expected miliacin  $\delta D$  values (-80 to -150‰) fall within this range. The  $H3^+$  factor was determined daily prior to analysis and ranged from 3.7 to 3.8 in the course of analysis.

## **5. Results**

### **a) Miliacin $\delta D$ values means and standard deviations**

Miliacin  $\delta D$  values range from -144.5‰ to -98.1‰; i.e. with a difference of almost 50‰ (Table 1, Fig. 47a). Standard deviations of the repeated analysis of each sample range from 0.3 to 12‰ with a mean standard deviation of 5.9‰. Miliacin  $\delta D$  values of individual plants were normally distributed (Figure 47b) about an average of -121.1‰ ( $\pm 9.1$  sd) (Kolmogorov-Smirnov,  $p<0.05$ ). When  $\delta D$  values average of each plant are again averaged by stand, they range from -132.8‰ to -102.8‰ (Figure 47c); i.e. a difference almost reaching 30‰. In this case, standard deviation of  $\delta D$  values in each stand ranges from 2.1 to 19.3‰, with a mean standard deviation of 6.9‰. Miliacin  $\delta D$  values per stand show a normal distribution (Figure 47d) with an average of -120.7‰ ( $\pm 6.5$  sd) (Kolmogorov-Smirnov,  $p<0.05$ ).



**Figure 47 : a- Distribution of  $\delta D$  values of miliacin extracted from the seeds of 61 plants collected in the Mézières-lez-Cléry field sorted by increasing plant height, which was considered pertinent due to the visual correlation between plant height and soil properties in the field. Maximum and minimum miliacin  $\delta D$  values and the corresponding range ( $-98\text{‰}$  to  $-144\text{‰}$  V-SMOW; range of  $\sim 50\text{‰}$  V-SMOW) are reported.; b- Frequency histogram of miliacin  $\delta D$  values of all plants with calculated mean ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ); c-  $\delta D$  values and standard deviation of miliacin  $\delta D$  values averaged per stand, sorted by increasing plant height. Maximum and minimum of averaged miliacin  $\delta D$  values (from  $-105$  to  $-135\text{‰}$  V-SMOW; range of  $30\text{‰}$ ) are reported; d- Frequency histogram of miliacin  $\delta D$  values averaged per stand with calculated mean ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ).**

**Tableau 8 : Inventory of millet plant samples by stand together with plant height, panicle weight, weight of 20 seeds, miliacin concentration in seeds and miliacin  $\delta D$  values and standard deviations of miliacin extracted from seeds. Average and standard deviation of miliacin  $\delta D$  values by stand are calculated as the arithmetic average and standard deviation of miliacin  $\delta D$  values of plants developed on the same stand. n represents the number of replicates per sample in GC-irMS.**

Sample n°	Stand	Plant height (cm)	Panicle weight (g)	Weight of 20 seeds (mg)	Miliacin concentration (ng.g <sup>-1</sup> seeds)	Miliacin $\delta D$ value (‰V-SMOW)	Standard deviation	n
183-33	183	33	0.35	74	240	-112.8	7.7	9
						-124.4	16.5	
183-35		35	0.4	59	139	-136.0	1.7	3
184-65		65	2.04	84	4775	-110.3	6.5	3
184-70	184	70	1.51	141	1292	-122.3	-116.4	6.6 6.0 3
184-73		73	3.11	136	1813	-116.5	6.5	3
185-79	185	79	1.59	123	438	-124.9	0.3	2
						-122.5	3.3	
185-81		81	2.09	125	2755	-120.2	1.5	3
186-73	186	73	1.76	123	350	-127.9	4.6	3
						-124.3	5.1	
186-80		80	1.68	123	702	-120.6	5.2	3
187-61	187	61	1.2	127	387	-125.9	11.1	3
						-120.6	7.5	
187-66		66	1.71	102	1026	-115.3	5.3	3
188-43	188	43	1.11	89	145	-132.4	-132.4	4.1 - 4
189-69		69	1.14	135	451	-106.4	2.0	3
189-71	189	71	3.3	129	481	-144.5	-123.5	6.4 19.3 2
189-74		74	1.1	93	566	-119.7	1.0	3
190-36		36	0.25	76	328	-118.7	4.0	2
190-39	190	39	0.36	73	351	-120.4	-121.0	10.3 2.6 2
190-41		41	0.4	88	296	-123.8	5.8	3
191-63	191	63	2.79	76	82	-125.4	-125.4	8.6 - 6
192-61	192	61	1.84	99	317	-102.8	-102.8	3.5 - 3
193-78	193	78	5.08	127	468	-117.2	9.6	3
						-115.2	2.9	
193-87		87	1.96	130	303	-113.1	2.5	3
194-79		79	3.8	130	572	-127.0	6.7	3
194-82	194	82	2.75	158	558	-119.5	-124.1	3.7 4.0 3
194-86		86	3.64	137	557	-125.8	5.4	3
196-87	196	87	8.78	135	629	-134.7	0.0	1
						-132.8	2.7	
196-88		88	7.81	142	94	-130.9	3.1	6
197-82	197	82	3.53	142	758	-134.8	5.3	3
						-123.7	11.8	
197-88		88	8.59	143	767	-125.0	5.1	3



197-93		93	2.94	148	261	-111.3		4.3		3
198-87		87	2.72	117	348	-124.3		11.1		6
	198						-119.7		6.5	
198-90		90	3.31	105	265	-115.2		10.0		8
199-74		74	3.06	140	250	-114.9		9.8		3
199-85	199	85	2.75	111	356	-116.6	-121.3	4.7	9.7	2
199-86		86	3.33	145	224	-132.5		6.7		3
200-26	200	26	0.13	25	156	-121.0	-121.0	10.4	-	6
201-36		36	0.38	123	295	-108.1		8.1		3
	201						-106.7		2.1	
201-41		41	0.74	121	323	-105.2		5.4		3
202-21		21	0.14	51	441	-98.1		11.3		2
202-54	202	54	1.93	117	344	-106.3	-105.8	6.9	7.5	6
202-60		60	2.71	125	353	-113.0		9.9		6
203-75		75	2.34	134	335	-109.6		9.9		3
203-81	203	81	8.06	144	511	-127.6	-122.1	2.8	10.8	3
203-82		82	3.9	147	707	-129.0		1.8		3
204-105		78	1.1	91	247	-117.1		10.3		6
204-78	204	90	3.07	123	230	-124.5	-121.0	6.6	3.8	7
204-90		105	1.69	132	359	-121.3		7.3		6
205-73		73	2.01	142	316	-122.7		5.8		3
205-75	205	75	2.13	127	339	-125.2	-122.0	7.1	3.6	3
205-84		84	3.21	133	331	-118.0		4.5		3
207-67		67	5.59	158	3370	-122.5		4.9		3
207-72	207	72	2.11	136	1028	-124.7	-125.5	4.3	3.5	2
207-90		90	7.01	146	693	-129.3		1.5		3
208-87		87	3.7	140	339	-110.4		12.0		2
	208						-115.4		7.0	
208-89		89	2.2	133	299	-120.3		6.1		3
209-55	209	55	0.82	82	2001	-126.8	-126.8	2.1	-	3
210-43		43	1.38	83	310	-120.9		3.6		3
210-50		50	4.28	151	89	-139.8		7.8		4
210-70	210	70	4.71	143	410	-122.3	-127.9	4.9	8.4	8
210-71		72	3.79	128	485	-133.7		4.8		4
210-72		74	3.63	136	383	-122.9		5.7		5

### **b) Comparison of miliacin $\delta D$ values with other parameters**

To examine whether miliacin  $\delta D$  values varied systematically with environmental condition, we tested the values for correlation with the following environmentally influenced parameters: standard deviation of miliacin  $\delta D$  values, plant height, panicle weight, 20 seeds weight and miliacin concentration. Plant heights range from 20 to 120cm, panicle weight from 0.1 to 8.8g, 20 seeds weight from 25 to 160mg and miliacin concentrations from 0.08 to 4.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  seed (Table 8). No linear relation could be established between miliacin  $\delta D$  values and other parameters ( $r^2 < 0.15$ ).

## **6. Discussion**

### **a) $\delta D$ of pentacyclic triterpenes**

Very few studies have reported  $\delta D$  values for pentacyclic triterpenes, probably because these compounds are secondary metabolites and constitute minor components in biological and geological systems, when compared to *n*-alkyl lipids. Average miliacin  $\delta D$  values ( $-121\text{‰}$  V-SMOW) are in agreement with some of the few other values that have been reported for pentacyclic triterpenes.  $\delta D$  values of  $-139$  and  $-171\text{‰}$  have been reported for lupenol,  $-142\text{‰}$  for lupenone,  $-144\text{‰}$  for an unidentified pentacyclic triterpenone and  $-151$  and  $-165\text{‰}$  for two unidentified pentacyclic triterpenols, all extracted from *Spartina alterniflora* (Sessions et al., 1990; Sessions, 2006). For taraxerol,  $\alpha$ -amyrin and an unidentified pentacyclic triterpene extracted from the surface sediments of a pond in Massachusetts,  $\delta D$  values were around  $-170$  /  $-180\text{‰}$  (Sauer et al., 2001). Various pentacyclic triterpenes extracted from *Daucus carota* were highly depleted, with  $-252\text{‰}$  for  $\beta$ - and  $\alpha$ -amyrins, and values ranging from  $-226$  to  $-239\text{‰}$  for unidentified pentacyclic triterpenols (Sessions et al., 1990).

In contrast to *n*-alkyl lipids (acetogenic lipids), which are produced from acetyl-CoA in the plastid, pentacyclic triterpenes are produced in the cytosol, also from acetyl-CoA, via the mevalonic pathway (Sessions et al., 1990; Lichtenthaler, 1999). This explains a systematic 50 to 100 $\text{‰}$  offset between *n*-alkyl lipids and sterols or triterpenols, directly from plants or from soils and sediments (Sessions et al., 1990; Chikaraishi et al., 2004; Chikaraishi and Narakoa, 2005; Chikaraishi et al., 2004; Chikaraishi et al., 2009; Huang et al., 2004; Chikaraishi and Narakoa, 2006). The origin of this difference is still unclear and could be related either to the source of hydrogen (directly from  $\text{H}_2\text{O}$  or *via* NADPH), distinct pools of NADPH within the cell or it could result from kinetic isotope effects associated to hydrogenation (Sessions et al., 1990; Chikaraishi et al., 2004; Chikaraishi et al., 2009).

Differences in  $\delta D$  among pentacyclic triterpenes with various structures (such as lupane, oleanane, ursane, taraxerane) could arise from fractionation intervening during the ultimate steps of their biosynthesis that involves the cyclisation of 2,3-oxidosqualene and subsequent rearrangements through methyl group and double bond migrations, and ring expansion/contraction

(Xu et al., 2004). In fact, very little is known on the fractionation of hydrogen isotopes associated to the synthesis of pentacyclic triterpenes. The  $\delta D$  of various pentacyclic triterpenes produced by a single plant could therefore provide key information on hydrogen isotopic effects associated to their synthesis, as it was remarkably as was performed for phytol (Chikaraishi et al., 2009).

#### **b) Compound-specific $\delta D$ variations over a small area**

The almost 50‰ range in miliacin  $\delta D$  values within the area of a single field is within the range of compound-specific  $\delta D$  variations of less plant specific compounds in larger-scale paleoenvironmental studies [see section 5.d)]. The importance of the 50‰ range can be put into perspective by comparing it with the ranges of compound-specific  $\delta D$  values recorded in the few other studies of plants over small areas, either under natural or controlled conditions.

Studies in natural systems of homogeneous climate (such as our study site) reveal large differences in  $\delta D$  values of plant lipids. In a study of 48 land and aquatic plant species grouped by life form growing in the catchment of a small pond,  $\delta D$  values of  $n$ -C<sub>30</sub> fatty acids varied by 100‰ between all species, 70‰ among tree species, and 40‰ among grasses (Hou et al., 2007). Within trees developed in the same area, the difference in  $n$ -alkane  $\delta D$  values can reach 30‰ for deciduous trees (*Betula* spp. and *Quercus* spp.) and up to 35‰ for evergreen trees (*Pinus strobus* and *Tsuga canadensis*) (Hou et al., 2007b). Similarly, a difference of ca. 60‰ was noted between  $\delta D$  values of  $n$ -alkanes produced by trees growing in woody grassland (*Atalaya* sp.) and trees growing in woodland (*Acacia* sp.) at few tens of meters of distance (Krull et al., 2006). When grasses are considered, the differences in  $\delta D$  values of  $n$ -alkanes extracted from different species growing in individual sites of the US Great Plains was as large as 50‰ (Smith and Freeman, 2006). Thus, the range of miliacin  $\delta D$  values we observed falls within the ranges observed for  $n$ -alkyl lipids extracted from various plants in natural conditions over a small area.

In controlled environment chambers, environmental variations that could affect the  $\delta D$  of biochemicals are reduced, when compared to natural systems. The range of  $\delta D$  values is thus expected to be narrower. Nevertheless,  $\delta D$  values of  $n$ -alkyl lipids from plants have been found to differ by as much as 90‰ between tree and grass species growing in a controlled environment chamber (Liu and Huang, 2008).  $\delta D$  values of  $n$ -alkanes and  $n$ -alkanoic acids each differed by a maximum of 60‰ between several grass species (Smith and Freeman, 2006; Hou et al., 2008). When  $\delta D$  values of  $n$ -alkanes were compared among species of a single photosynthetic pathway (C3 or C4), however, this difference was reduced to 30‰ (Smith and Freeman, 2006). Within tree species, a maximum of 30‰ difference in  $\delta D$  values of a single alkanoic acid was found among individuals of a single oak species (Hou et al., 2008). None of these studies (either under natural or controlled conditions) had more than four replicates per species, however, thereby limiting conclusions on intraspecies variability in  $\delta D$  values.

These large ranges in compound-specific  $\delta D$  values reported in both controlled and natural conditions have been attributed to several major causes that are, in most cases, interconnected.

Studies indicate that by taking up isotopically distinct water and through different transpiration dynamics, the  $\delta D$  values of the water used for lipid biosynthesis may vary systematically between plant life forms (e.g. trees, shrubs and grass). The  $\delta D$  values of soil water can decrease with depth due to a decreasing loss of D-depleted water as vapour during evaporation. Differences in depths of rooting systems among plant life forms can thus lead to uptake of waters with different  $\delta D$  values (Feakins and Sessions, 2010; Smith and Freeman, 2006; Krull et al., 2006; Sachse et al., 2009). Before its use in lipid biosynthesis, the water is exposed to further D-enrichment during transpiration and the magnitude of that enrichment may also vary by life form. The two fractionations; evaporation of soil water and transpiration may minimize or maximise differences between plant life forms in  $\delta D$  values of water used in lipid biosynthesis. For example, grasses tend to take up most of their water at the surface where it is most D-enriched whereas deeper soils are a more important source of water for trees. Tree leaves may have higher transpiration rates than grasses because their leaves are exposed to direct sunlight and wind exposure, and do not benefit from canopy effect and direct soil moisture (Hou et al., 2007). The D-enrichment of water taken up by grasses relative to water taken up by trees may thus be offset by lower water losses via transpiration in grasses than in trees.

Differences in leaf waxes  $\delta D$  values in distinct plants species also arise from differences in plant physiology and photosynthetic pathways. The impact of leaf morphology and architecture is still debated (Smith and Freeman, 2006). Differential fractionation of hydrogen isotopes between  $C_3$ ,  $C_4$  and CAM plants has also been proposed but there is still no consensus on whether this arises from isotope effects related to metabolisms or to physiological and morphological differences (Feakins and Sessions, 2010; Smith and Freeman, 2006; Liu and Huang, 2008; Chikaraishi et al., 2004; Chikaraishi et al., 2009; Bi et al., 2005). The last parameter to be taken into account for explaining the variability of biochemical  $\delta D$  values relates to the strategies developed by plants for their water use (Hou et al., 2007; Smith and Freeman, 2006; Sachse et al., 2006). The negative correlation between  $\delta^{13}C$  and  $\delta D$  values of plant lipids suggests that variable water use efficiency influences inter-species differences in leaf wax  $\delta D$  values (Feakins and Sessions, 2010; Hou et al., 2007b; Liu and Huang, 2008). None of these explanations can be invoked in our case that concerns a single biochemical produced by a single species developed under relatively homogeneous conditions.

### **c) Origin of variability in miliacin $\delta D$ values**

Our data bring new information about the spatial variability of compound-specific  $\delta D$  values. By focusing our study on a single compound specific to one plant, we reduce interspecies offsets

but also reduce potential variability related to micro-environmental conditions, biosynthetic and photosynthetic pathways and physiological factors (including leaf structure and rooting system). Despite these precautions, a large range of miliacin  $\delta D$  values (50‰) is found in millet seeds collected from plants developed on a ca. 1000 m<sup>2</sup> area. However, this range is not necessarily attributable to differences in environmental conditions.

The normal distribution of miliacin  $\delta D$  values per plant implies a single dominant controlling parameter. The lack of correlation of miliacin  $\delta D$  values with the standard deviation of these values and miliacin concentrations excludes any analytical bias. No correlation could be found between miliacin  $\delta D$  values and parameters related to plant yields (plant height, panicle weight and weight of 20 seeds). Because plant heights were visually correlated with soil properties in the field, this suggests that there is no relationship between miliacin  $\delta D$  values and soil properties. This is confirmed when intra- and inter-stand variability is compared. If soil properties were a major factor, one could expect larger differences between stands (at decimetric scale) than within a single stand, which shows similar soil properties at decimetric scale. The similarity of intra-stand (mean of standard deviation of miliacin  $\delta D$  values per stand; 6.9) and inter-stand (standard deviation of mean  $\delta D$  values per stand; 6.5) miliacin  $\delta D$  values variability thus allows us excluding decimetric-scale differences in soil properties as a dominant control parameter. Conversely, the Gaussian distribution of miliacin  $\delta D$  values suggests that precipitation  $\delta D$  and mean hydrological regime that prevail at the field scale constitute the dominant control parameters (Hou et al., 2008).

Because our study was focused on a single plant, several potential parameters (plant form, photosynthetic and biosynthetic pathways, plant physiology) that have been proposed to explain compound-specific  $\delta D$  differences in spatial studies [see 5.d)] can be discarded. Large-scale differences in soil properties cannot either be invoked. Although this remains to be tested, the dispersion of miliacin  $\delta D$  values could result from micro-scale heterogeneities in soil properties and/or in relative humidity. For example, the millet field was heterogeneously but densely covered by the weed *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) at harvest time. The competition for water uptake between these two plants could partially explain local differences in miliacin  $\delta D$  values. Alternatively, these differences could also be related to intrinsic (phenotypic and genotypic) variability within *P. miliaceum* (Zhang et al., 2009).

#### **d) Consequences on the climatic significance of compound-specific $\delta D$**

The maximum difference of miliacin  $\delta D$  values between plants analysed from the Mézières-lez-Cléry millet field is 50‰. This range must be compared to known ranges of compound-specific  $\delta D$  values found in both actual and ancient natural systems in order to estimate the confidence level of paleoclimatic interpretations based on the variations of  $\delta D$  values of lipids extracted from sediments archives. Leaf wax *n*-alkanes extracted from various deciduous trees or from superficial

lake sediments throughout a latitudinal transect (from 40°N to 70°N) in Europe, had  $\delta D$  values ranging from ca. -140 to -220‰ (i.e. a 80‰ range) (Sachse et al., 2004; Sachse et al., 2006). However, it is not clear whether this range of  $\delta D$  values purely reflects a climatic gradient or also attests to vegetation changes through latitude because the *n*-alkanes studied are common to a wide range of higher plant taxa. In this study, a wide variety of deciduous trees were analysed, with potentially large interspecies differences in compound-specific  $\delta D$  values (see section 4.2.). Nevertheless, such calibration studies permit inferences about shifts in compound-specific  $\delta D$  values with environmental and climatic variations. In sedimentary archives, 50‰ and 80‰ shifts in *n*-alkanes or *n*-acids  $\delta D$  in sediments were interpreted as the transition between a savannah and tropical forest due to different hydrological conditions (Schefuss et al., 2005; Jacob et al., 2007; Tierney et al., 2008). Thus, up to 80‰ range of compound-specific  $\delta D$  values in recent and ancient systems is indicative of highly contrasted environmental conditions. These ranges are in the same order as that found for miliacin  $\delta D$  values, at a single location. The overlap between the range of local variability under the same environmental regime and the range of drastic environmental changes could, if only the range is considered, induce serious doubt on the confidence level to which the  $\delta D$  of sedimentary lipids can be interpreted in paleoclimatology.

The number of samples of a single species analysed in this study permits a more thorough examination of the significance of the 50‰ miliacin range in  $\delta D$  values. Miliacin  $\delta D$  values follow a normal distribution (average = -121.1‰ of all plants and -120.7‰ of plants averaged by stand; Figure 47). The dispersion of miliacin  $\delta D$  values (estimated from the skewness of the Gaussian distribution) is higher when all plants are taken into account (skewness = -1) than when they are averaged by stand (skewness = -0.3). In the meantime, the range of  $\delta D$  values diminishes from ca. 50‰ (all plants) to 30‰ (average by stands). 90% of miliacin  $\delta D$  values per plants are comprised between -112 and -130‰ V-SMOW, i.e. a 20‰ range (Figure 47b). This range is evidently reduced when miliacin  $\delta D$  values are averaged by stand (from -114 to -126‰; i.e. a range of 12‰; Figure 4d). Consequently, the probability for obtaining miliacin  $\delta D$  values that are representative of the whole millet field from remotely sampling a single plant appears rather high.

This information is essential considering the scope of this study that is to measure, over a small area, the variability of  $\delta D$  values of a molecular biomarker extracted from a single plant in order to estimate the confidence level in  $\delta D$  values acquired on sedimentary lipids. Sedimentary lipids constitute an integrative signal of all lipids produced in the catchment (Hou et al., 2007). The relevant question for paleoenvironmental research is thus how the original lipid  $\delta D$  value can then be archived in sediments? From the source plant, lipids can suffer (i) selective degradation during diagenesis; (ii) temporal offsets due to the time of transportation from the plant to the sediment and



(iii) mix with other lipids produced in the catchment either by other plant species under different environmental conditions (sun exposure, soil properties...). For example, a significant D depletion, attributed to early diagenetic processes, was noted between plant and soil *n*-alkyl lipids whereas isoprenoids were less affected (Chikaraishi and Narakoa, 2006). A similar depletion was observed for sedimentary lipid  $\delta D$  values when compared to plant lipid  $\delta D$  values. In this case, these differences were attributed to temporal offsets between the time lipids were produced and their accumulation in sediments (Sachse et al., 2006).

If we exclude these temporal and diagenetic offsets, our assumption is that the  $\delta D$  value of sedimentary miliacin would record the weighted mean miliacin  $\delta D$  value of all millet biomass produced in the catchment; i.e. the variability is restrained to the mean value, with no distortion. This hypothesis should be verified by a detailed study of the propagation of variability from the source to the sedimentary archive, i.e. the representativeness of sedimentary lipid  $\delta D$  compared to catchment-scale lipid  $\delta D$  (Zhang et al., 2009).

## **7. Conclusion**

This study examines the confidence level of the climatic inferences that can be made from  $\delta D$  measures on molecular biomarkers preserved in lake sediments that may have originated under a variety of environmental conditions throughout a catchment. The analysis of the spatial distribution of  $\delta D$  values measured on a single molecule extracted from a single plant grown in a field with heterogeneous soil properties shows that values are normally distributed with a maximum difference of 50‰. This large difference is not necessarily related to environmental conditions but may instead reflect water competition with weeds or plant genetic differences.

Despite this difference, the normal distribution of  $\delta D$  values implies that the mean  $\delta D$  value represents the environmental conditions of the area sampled. Similarly, the  $\delta D$  values of miliacin in lake sediments may average miliacin  $\delta D$  values over the source area.

## **8. Acknowledgments**

This work was undertaken within the PalHydroMil project, supported by Agence Nationale de la Recherche grant (ANR JCJC, 2011-2013) and NSF project n° BCS0551668. Mr Sévin and Mr Beaulieu are acknowledged for giving access to the millet field. N. Bossard beneficiates from a PhD grant provided by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (Action Thématique Prioritaire, 2009-2012). V.J. Terwilliger is hosted at ISTO under the auspices of Le Studium® (Institute for Advanced Studies). The authors wish to thank J.R. Disnar and S. Gogo for useful discussions.

## Synthèse

Afin d'étudier la distribution et la variabilité du  $\delta D$  moléculaire à l'échelle d'un bassin versant, j'ai mesuré les valeurs de  $\delta D$  de la miliacine extraite de graines de millet se développant dans un champ à Mézières-lez-Cléry, qui constitue un sous-échantillon raisonnable d'un bassin versant.

Les valeurs de  $\delta D$  de la miliacine dans le champ de Mézières-lez-Cléry ont une moyenne de  $-121\text{‰}$  V-SMOW qui est supposée correspondre aux conditions hydrologiques moyennes ressenties par les plantes cultivées dans ce champ.

La variabilité du  $\delta D$  observée dans le champ n'est pas site dépendante, mais plante dépendante. Il est supposé que cette variabilité n'est pas due à une évaporation différente entre les différents endroits du champ mais plutôt à des conditions d'humidité relative différentes (couvert végétal éparse pour un champ de millet) et / ou un prélèvement de l'eau source à différentes profondeurs.

Nous avons donc partiellement répondu à l'une des questions concernant les modalités d'intégration dans le temps et l'espace des biomarqueurs moléculaires et de leur composition isotopique, considérée par Sachse et al. (2012) comme l'une des inconnues à lever pour améliorer l'interprétation des valeurs de  $\delta D$  de biomarqueurs extraits de sédiments. L'étape suivante doit nous permettre de vérifier trois autres points sur ces considérations d'intégration spatio-temporelle :

- la variabilité du  $\delta D$  miliacine moyen du champ de Mézières est-elle explicable par la variabilité des valeurs  $\delta D$  de l'eau météorique ?
- le  $\delta D$  de l'eau du sol dans ce champ montre-t-il des différences notables par rapport à celui des précipitations ?
- le transfert de la miliacine depuis la plante jusqu'au sol s'accompagne-t-il d'un fractionnement significatif ? Nous considérons ici que ce transfert est la première étape du transfert de la miliacine depuis la plante source jusqu'à l'archivage « définitif » dans les sédiments.



#### D. Variabilité temporelle du $\delta D$ miliacine de 2008 à 2012

Le  $\delta D$  moléculaire est utilisé afin de reconstituer le  $\delta D$  de l'eau météorique qu'utilisent les plantes lors de la biosynthèse (Marino et Deniro, 1987 ; Liu et Huang, 2005 ; Sachse et al., 2006 ; Smith et Freeman, 2006 ; Hou et al., 2007 ; Makou et al., 2007 ; Sachse et al., 2009). Comme l'ont montré Bossard et al. (2011), les plants de millet de Mézières produisent une miliacine dont les valeurs  $\delta D$  ont une large gamme mais avec une distribution normale. Malgré cette forte variabilité, le  $\delta D$  miliacine moyen est supposé représentatif du site (Bossard et al., 2011), ce qui corrobore les travaux de Hou et al. (2007). L'objectif de cette partie est de vérifier que les valeurs  $\delta D$  miliacine des graines des plants de Mézières récoltées sur plusieurs années reflètent la variabilité temporelle du  $\delta D$  météorique à Mézières. Cette hypothèse a été vérifiée pour d'autres sites en ce qui concerne des composés ubiquistes comme les *n*-alcanes de sédiments lacustres superficiels, sans distinction de provenance de l'organisme source (Sachse et al., 2004 ; Sachse et al., 2010), mais aussi pour d'autres molécules ubiquistes tels les acides gras dont les valeurs ont été mesurées directement à partir des feuilles des plantes (Zhou et al., 2010).

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai comparé sur plusieurs années les valeurs  $\delta D$  des précipitation avec les valeurs  $\delta D$  de la miliacine de la région afin de calculer le fractionnement biosynthétique apparent (Equation 1) et pour évaluer la réponse du  $\delta D$  de la miliacine aux variations du  $\delta D$  des précipitations.

$$\text{Equation 1: } \epsilon_{\text{app}} = 1000 [(\delta D \text{ compound} + 1000) / (\delta D \text{ Source Water} + 1000) - 1]$$

Le  $\delta D$  des précipitations a été mesuré par le BRGM d'Orléans dans le cadre de la constitution d'une base de donnée française des isotopes (BDISO), au niveau de la station orléanaise située sur le site du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) (station 03982X0556/PLUV-1) de 2009 à 2013 (Millot, résultats non publiés). J'ai pour ma part mesuré le  $\delta D$  miliacine de graines récoltées en 2008, 2009, 2010 et 2011. J'ai pu obtenir des graines provenant des récoltes de Mr Sévin de 2009, 2010 et 2011 sur le champ de Mézières-lez-Cléry (qui intègre donc tout le champ) ainsi que des graines provenant des Etablissements Leplâtre (2008-2009) qui cumulent les récoltes de millet des agriculteurs locaux. Je dispose ainsi de deux niveaux d'intégration spatiale (parcelle et local).

**Tableau 9 : Valeurs  $\delta D$  moyen annuel pondéré des précipitations et  $\delta D$  de la miliacine (‰ V-SMOW). (L) correspond aux graines fournies par la Société Leplâtre, (M) correspond aux graines récoltées dans le champ de Mézières.**

Année	$\delta D$ précipitation	$\delta D$ miliacine
2008 (L)	?	-126+/-8
2009 (L)	-40,5	-122+/-4
2009 (M)	-40,5	-122+/-7
2010 (M)	-52,2	-132+/-7
2011 (M)	-37,4	-121 +/- 3

Les résultats donnés dans le Tableau 9 montrent que la miliacine extraite des graines du champ de Mézières et celles fournies par la société Leplâtre ont les mêmes valeurs  $\delta D$  pour l'année 2009 (seule année pour laquelle nous disposions des deux stocks de graines). Bien que cette comparaison sur une seule année mérite confirmation, ce résultat semble indiquer qu'il n'existe pas de différence notable entre le  $\delta D$  de la miliacine intégratif des conditions régnant sur la parcelle et le  $\delta D$  de la miliacine intégratif des conditions locales. Ainsi peut-on considérer que le champ de Mézières-lez-Cléry n'est pas significativement différent de la moyenne de l'ensemble des champs de la région desquelles proviennent les graines de la Société Leplâtre.

J'ai ensuite voulu affiner cette étude en m'interrogeant sur les précipitations « efficaces » en termes d'enregistrement de leur composition isotopique par la miliacine. J'ai donc rapporté les moyennes pondérées des valeurs de  $\delta D$  sur les quatre mois de croissance du millet (juin, juillet, août, septembre), sur l'été, et pour les années de 2009, 2010 et 2011 civiles (de Janvier à Décembre), saisonnières (Mars à Février) et année millet, c'est-à-dire en finissant l'année lorsque le millet est récolté (Octobre-Septembre) et les ai comparées aux valeurs de  $\delta D$  de la miliacine (Tableau 10).

**Tableau 10 :  $\delta D$  miliacine ( $\delta D_{mil}$ ) en fonction de l'année de récolte du millet et  $\delta D$  des précipitations mensuelles pondérées. Les valeurs isotopiques sont exprimées en‰ V-SMOW.**

	$\delta D_{mil}$	$\delta D$ des eaux météoriques							
année	Mézières	Jan - Déc	Mars - Fév	Oct. – Sept.	moy. été	juin	juillet	août	Sept.
2009	-122	-42	-42,7	-48,2	-33,2	-34,4	-33,9	-10,4	-28,7
2010	-132	-53,2	-51,3	-43,2	-38,1	-44,5	-32,8	-32,8	-44,7
2011	-121	-41,4	-40,5	-50,7	-36,8	-26,9	-47,6	-30,1	-30,3
2012		-43,6	-47	-42,5	-36,2	-36,7	-38,7	-30,3	-32

A partir de ce tableau, nous avons calculé le fractionnement biosynthétique apparent entre la miliacine et les différentes eaux de pluie. Ces résultats apparaissent dans le Tableau 11.

**Tableau 11 : Fractionnement biosynthétique apparent entre la miliacine et les eaux de pluie selon la formule présentée en équation 1 avec l'écart-type de la moyenne entre les différentes années pour chaque fractionnement biosynthétique apparent calculé.**

	Fractionnement biosynthétique apparent entre la miliacine et les eaux de pluie de								
année	Jan - Déc	Mars - Fév	Oct. – Sept.	moy. été	juin	juillet	août	Sept.	
2009	-84	-83	-78	-92	-91	-91	-113	-96	
2010	-83	-85	-93	-98	-92	-103	-103	-91	
2011	-83	-84	-74	-87	-97	-77	-94	-94	
2012									
Ecart-type	0,2	1,1	10,0	5,1	3,2	12,8	9,5	2,3	

Etrangement, les fractionnements biosynthétiques incorporant les eaux de pluie des mois d'hiver arrivant après la récolte du millet sont ceux dont le fractionnement biosynthétique sont les plus constants ( $-84 \pm 0,2$  et  $-84 \pm 1$ ). Cependant, si l'on prend la moyenne annuelle des eaux de pluie d'octobre à septembre, ce qui correspondra aux eaux de pluie annuelles stockées avant la culture du millet, on trouve un écart-type important. Cet écart-type est dû au fait que la moyenne des eaux de pluie de octobre 2009 à Septembre 2010 sont différentes par rapport aux deux autres années en étant plus enrichie en D en particulier due à des pluies plus importantes en été (+60mm par rapport aux deux autres années). Les plantes ont un fractionnement biosynthétique apparent variant fortement pour les mois de juillet et août (12,8 et 9,5 respectivement) alors qu'il est inférieur pour les mois de juin, septembre et la moyenne des eaux de pluie de l'été (3,2, 2,3 et 5,1 respectivement).

Considérant que le  $\delta D$  miliacine ne peut refléter le  $\delta D$  des eaux météoriques futures, il semblerait que si le  $\delta D$  miliacine reflète un  $\delta D$  des eaux météoriques, ce serait

alors le  $\delta D$  des eaux de pluie de septembre à partir du moment où les graines sont formées, c'est-à-dire en fin de croissance de la plante. La même chose a été observée par Sachse et al. (2010). Pour cet auteur, les valeurs  $\delta D$  des *n*-alcanes extraits de *Hordeum vulgare* ne sont pas corrélées aux valeurs  $\delta D$  des eaux météoriques, mais aux valeurs  $\delta D$  de l'eau foliaire au moment de la formation des feuilles. De même, Sessions (2006) a montré que les valeurs  $\delta D$  des acides gras variaient au cours du temps du fait d'un rapide turn-over : la formation d'une nouvelle génération d'acides gras enregistre les nouvelles valeurs  $\delta D$  de l'eau intracellulaire. Cette hypothèse, selon laquelle le  $\delta D$  de la miliacine est principalement contrôlé par le  $\delta D$  des eaux qui alimentaient la plante au moment de la synthèse de la miliacine (et donc des graines) sera développée plus avant dans la partie "Calibration". Nous avons en effet fait varier au cours du développement de la plante le  $\delta D$  de la solution hydroponique afin de préciser la période « efficace » d'acquisition du signal isotopique par la molécule.

Si l'eau météorique enregistrée est bien celle de septembre, on peut remarquer qu'il a fallu un écart de près de 15‰ du  $\delta D$  des précipitations pour obtenir un écart de 10‰ du  $\delta D$  miliacine (Tableau 9). L'amplitude de variation du  $\delta D$  miliacine moyen du champ ne suit donc pas exactement l'amplitude de variation du  $\delta D$  des précipitations au cours du temps. Il semblerait même que, si l'on considère que le  $\delta D$  des eaux de pluie de septembre est le facteur contrôlant, pour un enrichissement en  $\delta D$  miliacine de 10‰ V-SMOW, il faille un enrichissement du  $\delta D$  des eaux de pluie de près de 15‰ V-SMOW. Encore une fois, cette hypothèse n'est émise que pour une année qui présente une particularité par rapport aux deux autres, et nécessiterait plus de données.

Puisque nous supposons que le signal enregistré par les valeurs de  $\delta D$  miliacine est le signal des eaux de pluie de septembre, nous allons maintenant nous intéresser aux valeurs isotopiques de l'eau du sol et à la variabilité de ces valeurs.

## E. Eau source dans le champ de Mézières-lez-Cléry

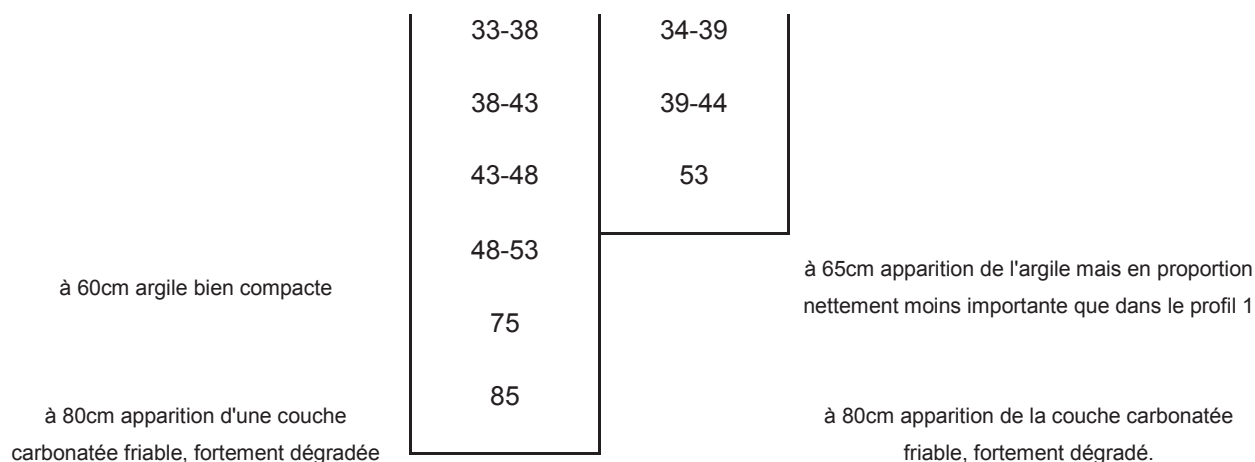
L'une des conclusions de l'article RCMS (Chapitre II Partie C) était que des conditions micro-environnementales pouvaient expliquer la variabilité du  $\delta D$  miliacine. Lors du stage de Manon Béchard, en mars 2011, nous avons prélevé deux « carottes » de sol dans deux sites différents (Figure 48, Tableau 12) afin de mesurer d'éventuelles disparités dans les valeurs de  $\delta D$  de l'eau du sol avec la profondeur. Les profils de sols sont détaillés dans le Tableau 12. Le  $\delta^{18}O$  de l'eau du sol a été mesuré à BioEMCO et est illustré en fonction de la profondeur en Figure 49. Nous n'avons pu mesurer le  $\delta D$  de cette eau du fait d'une trop faible quantité en eau dans les échantillons de sol. Cependant, nous avons extrapolé les valeurs de  $\delta D$  l'eau du sol, et son évolution en fonction de la profondeur, à partir des valeurs de  $\delta^{18}O$  mesurées (détaillé ci-après).



Figure 48 : A. Vue générale du champ de Mézières. B. Vue d'un carottage de sol du champ de Mézières.

Tableau 12 : Descriptif du profil des deux carottes prélevées dans le champ de Mézières.

Commentaire pour carotte 1	Profondeur échantillonnage (cm)		Commentaire pour carotte 2
	Profil 1	Profil 2	
Couche sèche	0-4	0-5	Couche sèche
Strate visuellement humide	4-8	7-9	Strate visuellement humide
	10-13	9-13	
	16-19	13-16	
	20-25	20-27	
	25-30	27-34	



Les deux profils des carottes sont similaires. On peut d'abord observer une couche contenant très peu d'eau jusque 4cm pour la carotte 1, jusque 5cm pour la carotte 2. Ensuite, le sol présente une couleur un peu plus foncée et des teneurs en eau plus élevées. Des échantillons de sol ont été prélevés dans le premier horizon, puis dans les différents niveaux indiqués dans le Tableau 12. Une couche argileuse apparaît dans les deux carottes, à 60cm pour la 1, à 65cm pour la 2. Et enfin à 80cm, pour les deux carottes, apparaît une couche carbonatée friable et fortement dégradée.

Le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau extraite des sols est représenté en vis-à-vis de la profondeur sur la Figure 49. La valeur médiane de la profondeur à laquelle l'eau a été extraite est utilisée pour réaliser le graphique, c'est-à-dire que pour l'étage 0--5cm, la valeur de -2,5 est retenue.

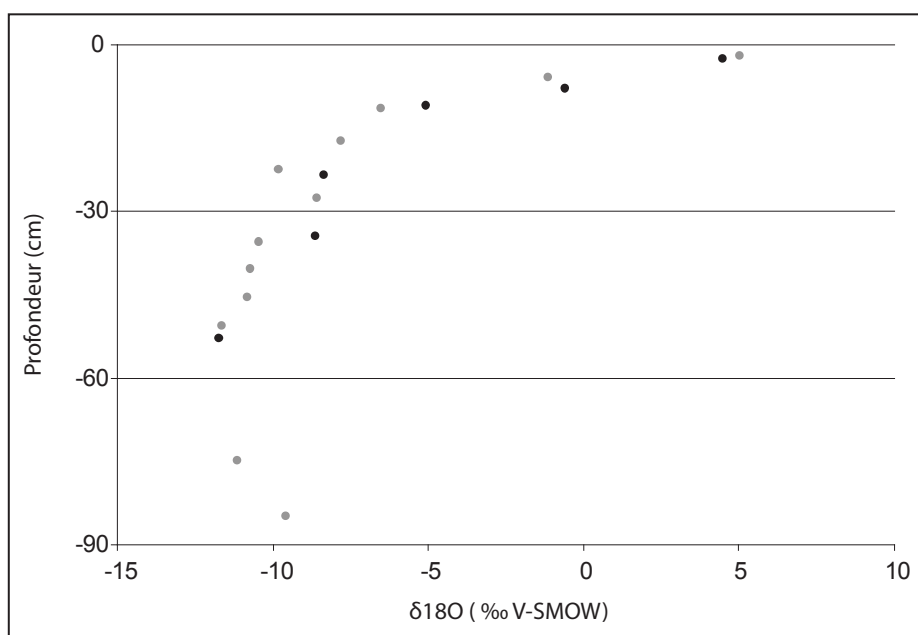


Figure 49 : Evolution du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du sol avec la profondeur.

Deux zones apparaissent très clairement dans le sol. Un premier niveau, de 0 à 30cm de profondeur, avec des valeurs de  $\delta^{18}\text{O}$  diminuant de +5 à -10‰ V-SMOW. Puis en dessous de cette zone, une zone avec des valeurs de  $\delta^{18}\text{O}$  autour de -10‰ V-SMOW. De -30cm à 0cm se trouve la zone d'évaporation de l'eau du sol, ce qui explique cet enrichissement en  $^{18}\text{O}$ . Plus en profondeur se trouve une eau avec un  $\delta^{18}\text{O}$  un peu plus constant, qui n'est plus soumise à l'évaporation. Cette eau est censée refléter l'eau météorique (Boujoumlaoui et al., 2008).

Le  $\delta^{18}\text{O}$ , le  $\delta\text{D}$  et la quantité d'eau météorique précipitée depuis novembre 2010 est reporté dans le Tableau 13 puisque c'est la période supposée nous intéresser.

**Tableau 13 : Valeurs de  $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta\text{D}$  des eaux météoriques (exprimés en‰ V-SMOW) et hauteur d'eau (en mm) mesurées par le BRGM dans les précipitations antérieures au prélèvement des carottes.**

date	Hauteur d'eau	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta\text{D}$
nov-10	84	-11,2	-74,4
déc-10	104	-12,7	-86,6
janv-11	35	-8,3	-61,9
févr-11	31	-5,3	-35,3
mars-11	19	-2,9	-16,2
avr-11	14	-2,3	-17,0

Les valeurs  $\delta^{18}\text{O}$  des échantillons les plus profonds (autour de -10‰ V-SMOW) semblent correspondre au  $\delta^{18}\text{O}$  des eaux de pluie de l'hiver précédent (novembre/décembre 2010). Ces valeurs de  $\delta^{18}\text{O}$  correspondent aussi aux quantités d'eau les plus importantes qui ont précipité fin 2010. On peut donc penser que l'eau profonde a conservé la signature isotopique des mois hivernaux.

Nous pouvons obtenir une projection des valeurs de  $\delta\text{D}$  de l'eau du sol en utilisant des relations établies entre le  $\delta\text{D}$  et le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du sol. Ainsi, en surface, l'expression du  $\delta\text{D}$  en fonction du  $\delta^{18}\text{O}$  se note :  $\delta\text{D}=3,4\delta^{18}\text{O}-22,8$  ( $r=0,98$ ) alors qu'elle est notée  $\delta\text{D}=8\delta^{18}\text{O}+10$  pour l'eau en profondeur (Boujamlaoui et al., 2005 ; Craig, 1961). Cette différence est expliquée par le fait que l'eau de surface est soumise à l'évaporation alors que l'eau plus en profondeur est considérée comme une eau infiltrée et directement corrélée aux eaux météoriques (Craig, 1961). Bien que cette approximation pour le  $\delta\text{D}$  puisse être critiquable, elle respectera le principe selon lequel, lorsqu'une eau est enrichie en  $^{18}\text{O}$ , elle sera enrichie en D. Pour la région d'Orléans, la droite des eaux météoriques suit cette équation :

$$\delta\text{D} = 7,48 \delta^{18}\text{O} + 6,24 \text{ (Milot et al., 2010)}$$



Lorsque seules les précipitations d'été depuis 2009 sont prises en compte (2008 n'ayant pas de relevé), l'équation est de la forme :  $\delta D = 5,9619\delta^{18}O - 4,4123$ , avec une variabilité du  $\delta D$  de plus de 35‰ (maximum de -10‰ et minimum de -45‰).

Les extrema donnés par l'équation d'évaporation du sol et celle de la droite des eaux météoriques à Orléans seraient donc pour le  $\delta D$  de -6‰ V-SMOW en surface et d'environ -70‰ V-SMOW en profondeur en utilisant les équations des droites météoriques définies pour Orléans. Le  $\delta D$  de l'eau en profondeur est assez proche de celui des précipitations de l'hiver 2010-2011 qui est d'environ -80‰ V-SMOW (Tableau 13 ; Millot et al., 2010). Donc l'eau en profondeur a la même signature  $\delta D$  et  $\delta^{18}O$  que l'eau hivernale et est bien une eau non soumise à l'évaporation.

Considérant la variabilité des valeurs isotopiques de l'eau du sol, la profondeur d'extraction racinaire pourrait donc être une cause majeure de la variabilité du  $\delta D$  de la miliacine dans le champ de Mézières-lez-Cléry. Cependant, l'eau la plus proche de la surface, qui est la plus évaporée et la plus enrichie, est aussi la plus rare, la teneur en eau dans le sol augmentant avec la profondeur. On peut ainsi supposer que les plantes puiseront l'eau profonde, avec un  $\delta D$  proche des valeurs isotopiques des eaux météoriques. Ainsi, si les valeurs moyennes de  $\delta D$  miliacine des graines de millet du champ de Mézières-lez-Cléry semblent corrélées aux moyennes annuelles du  $\delta D$  des eaux de précipitations, c'est sans doute que le millet puise en profondeur dans le sol une eau reflétant cette moyenne annuelle. Cette hypothèse pour le millet peut plus généralement expliquer que le  $\delta D$  de composés organiques ubiquistes suit le  $\delta D$  des eaux météoriques (Sachse et al., 2004, 2010, 2012 ; Gleixner et Mugler 2005 ; Garcin et al., 2011...). Il faut cependant tenir compte du fait que le  $\delta^{18}O$  de l'eau mesuré l'a été au mois de mars et n'est peut-être pas représentatif des conditions estivales.

La Partie D du Chapitre III laissait penser que le  $\delta D$  miliacine est fonction du  $\delta D$  des eaux de pluie au temps de la formation des graines ( $\delta D$  de l'eau de pluie de septembre). Il semblerait plutôt que le  $\delta D$  de l'eau dans les sols corresponde au  $\delta D$  annuel moyen pondéré.

Comment pourrait-on alors enregistrer l'eau de pluie correspondant au temps de la formation de la miliacine alors que l'on retrouve les valeurs  $\delta D$  des eaux de pluie hivernale, eaux de pluie quantitativement les plus importantes dans le sol ?

Deux solutions peuvent être proposées :

1°/ La plante prélève effectivement l'eau de pluie au temps de la formation des composés, et ce par deux processus possible :

- Elle capte l'eau avant que celle-ci ne rejoigne la zone inférieure à 30cm et donc la plante enregistre ainsi l'eau au temps de la formation du composé. Cette hypothèse n'est pas la plus vraisemblable, puisque le moment de pluie correspondra aussi au moment où la plante absorbera



le moins d'eau, du fait d'une moindre transpiration. Lorsque la transpiration de la plante sera à nouveau facilitée, l'évaporation de l'eau du sol pourra elle aussi reprendre de façon plus intense que pendant la pluie.

- Le deuxième processus impliquerait que l'eau dans le sol en été aurait le même  $\delta D$  que les eaux de pluie de l'été, par exemple en abaissant la limite d'évaporation de l'eau du sol. Il faudrait donc mesurer le  $\delta D$  et/ou  $\delta^{18}O$  de l'eau du sol lorsque le couvert végétal est présent en été afin de déterminer exactement quelles sont les valeurs isotopiques ( $\delta D$  et  $\delta^{18}O$ ) de l'eau absorbée par la plante en septembre.

2°/ Indépendamment de l'eau météorique qui serait alors considérée comme constante puisque l'eau annuelle est archivée dans les sols profonds, ce sont les conditions aériennes qui conditionnent le  $\delta D$  de l'eau de la feuille et ainsi le  $\delta D$  moléculaire. Cette hypothèse semble la plus vraisemblable puisque elle aurait l'avantage d'expliquer que le  $\delta D$  de composés ubiquistes enregistre le  $\delta D$  météorique (puisque'il moyenne les conditions environnementales affectant l'ensemble de ses diverses sources) alors que le  $\delta D$  d'un composé spécifique retracerait plutôt les conditions environnementales aériennes particulières, telle que l'humidité relative.

En conclusion, la variation du  $\delta D$  d'un composé ubiquiste enregistrera la variation du  $\delta D$  météorique alors que la variation du  $\delta D$  d'un composé spécifique enregistrera la variation des conditions hydrologiques « aériennes ». En effet, un composé ubiquiste sera synthétisé par de multiples plantes, et donc déjà soumis à différentes humidités relatives. Par contre, toutes ces plantes prélèveront une eau profonde, qui sera la moyenne du  $\delta D$  météorique annuel. A l'inverse, un composé spécifique, qui ne proviendra que d'une ou peu de plantes, enregistrera les différences de conditions ressenties par la plante, et donc plutôt l'humidité relative que le  $\delta D$  des eaux météoriques, même si le  $\delta D$  du composé spécifique dépendra également du  $\delta D$  météorique retrouvé dans le sol. Cette hypothèse pourrait ainsi permettre d'expliquer le décalage entre l'évolution du  $\delta D$  miliacine et l'évolution du  $\delta D$  météorique (un décalage de l'ordre de 15‰ de l'eau météorique pour un décalage de 10‰ pour le  $\delta D$  miliacine). Ce travail de suivi temporel du  $\delta D$  miliacine comparé au  $\delta D$  météorique nécessiterait toutefois un plus long suivi afin de valider ou invalider cet argumentaire.

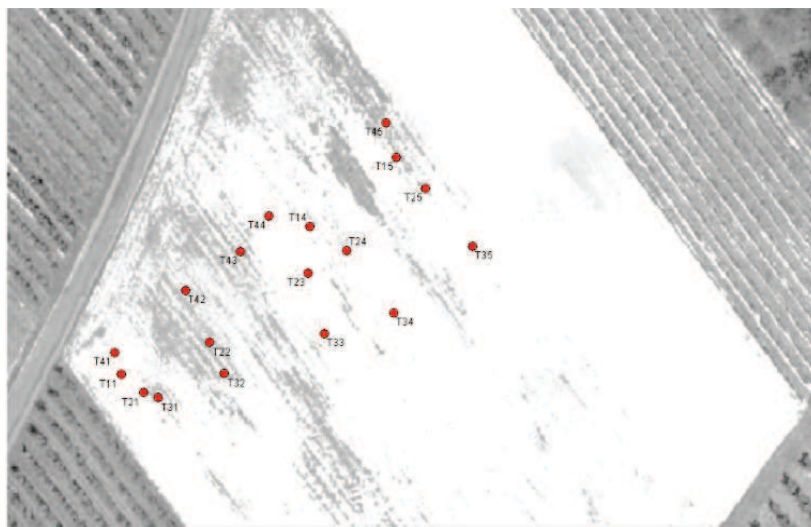
## F. Transfert du $\delta D$ miliacine de la plante au sol

La plante enregistre donc les conditions environnementales régnant lors de la synthèse de ses composés. La question qui suit est la modalité de l'archivage de ces molécules et de leur composition isotopique dans le sol (Sachse et al., 2012 ; Chapitre I). Le temps que met la molécule à atteindre l'archive, la représentativité d'une année par rapport à une autre, autant de questions qui ne sont que rarement abordées. Cette partie va donc concerner les modalités d'intégration spatiale et temporelle durant le transfert plante/sol. Le sol n'est qu'une archive temporaire dans le transfert de la plante à l'archive sédimentaire. Cependant le sol de Mézières-lez-Cléry a été utilisé car il est facilement comparable aux plantes qui s'y développent. On a pu voir précédemment qu'une forte hétérogénéité du  $\delta D$  miliacine existait à l'échelle des plants. Qu'en est-il dans le sol ?

Nous allons comparer les valeurs  $\delta D$  miliacine dans le sol par rapport au  $\delta D$  miliacine des plants.

- Retrouve-t-on une variabilité identique ? Le choix du champ de Mézières permet de faire une correspondance entre les sites sur lesquels les plantes ont été prélevées et certains sols.
- La miliacine est-elle affectée par la diagenèse, ce qui peut avoir un impact sur son  $\delta D$  ?
- Quelles sont les modalités d'intégration temporelle dans cette archive transitoire, comment les stocks produits sur plusieurs années sont-ils compilés ?

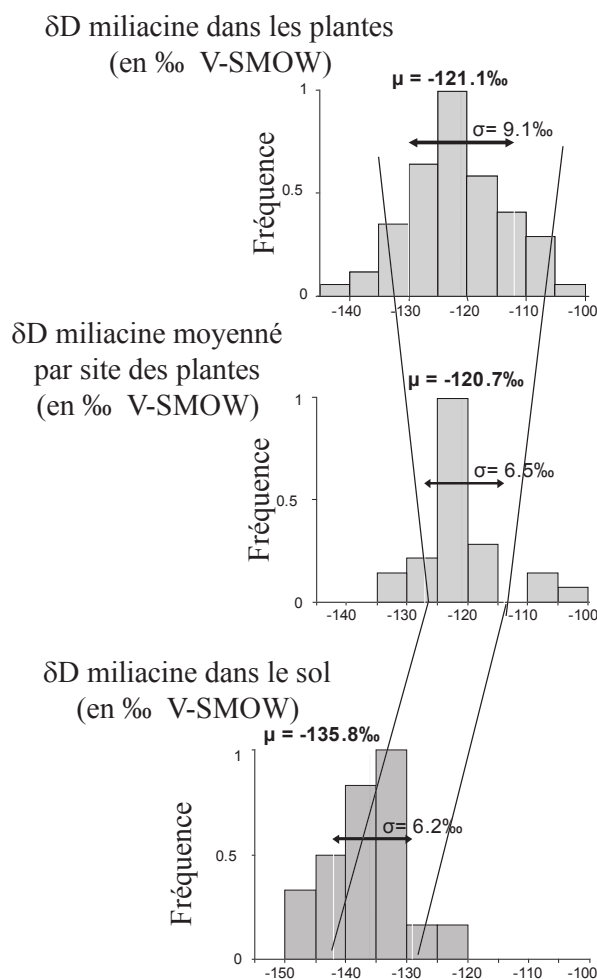
Toujours dans le cadre du stage de fin d'étude de Manon Béchard, le sol du champ de Mézières-lez-Cléry a été prélevé en mars 2011, en 20 points, respectant à peu près 4 transects de 5 points chacun (Figure 50). Après avoir éliminé les 2-3 premiers cm, nous avons prélevé le sol sur une profondeur de 5cm, considérant que le sol du champ étant cultivé, il serait homogène en profondeur et qu'il ne serait pas utile de prélever plus profond, voir à différents niveaux. Le sol a été séché à l'étuve pendant 48h puis tamisé.



**Figure 50 : Répartition spatiale des échantillons de sols prélevés dans le champ de Mézières-lez-Cléry.**

Les valeurs du  $\delta D$  de la miliacine du sol ont été mesurées. Elles varient de -146‰ à -124‰ V-SMOW, c'est-à-dire une gamme de 22‰. Cette gamme est deux fois inférieure à ce qui est observé pour les plantes dans le champ de Mézières. La moyenne du  $\delta D$  miliacine des sols est de -135.8 avec un écart-type de 6.2. Les données sont représentées par fréquence vis-à-vis des valeurs  $\delta D$  miliacine des graines des plantes de l'article RCMS (Figure 51). Le  $\delta D$  miliacine du sol présente une variabilité d'environ 6‰ V-SMOW, ce qui correspond à la variabilité calculée lorsque les différents plants sont regroupés par site (partie C). Le  $\delta D$  moyen de la miliacine du sol présente un décalage de 16‰ comparé à la moyenne du  $\delta D$  des plantes analysées en 2009. Les valeurs  $\delta D$  miliacine du sol ne sont pas corrélables aux valeurs  $\delta D$  miliacine des graines des plantes ayant poussé à cet emplacement en 2009 pour les sites qui correspondent entre eux.

La variabilité spatiale du  $\delta D$  miliacine des graines des plantes n'ayant pas été étudiée après 2009, il n'est pas possible de les comparer ensuite.



**Figure 51 : Histogrammes de fréquence du  $\delta D$  miliacine depuis la plante jusqu'au sol (toutes les valeurs  $\delta D$  sont exprimées en‰ V-SMOW).**

Comme décrit plus haut, le  $\delta D$  miliacine moyen des plantes est de -121‰ V-SMOW, avec un écart-type de 9‰. Lorsque les plantes sont regroupées par site, la moyenne du  $\delta D$  miliacine des plantes groupées par sites reste sensiblement identique avec une valeur de -121‰ V-SMOW, cependant l'écart-type est réduit à 6‰ V-SMOW. Le  $\delta D$  miliacine des sols moyen est de -136‰ V-SMOW, c'est-à-dire un décalage de 16‰ par rapport au  $\delta D$  miliacine des plantes. Cependant l'écart-type reste identique à celui retrouvé lorsque le  $\delta D$  miliacine est moyenné en fonction des sites. Ainsi, malgré les labours, les valeurs  $\delta D$  miliacine ne sont pas homogénéisées lors du transfert au sol par rapport à la moyenne des plantes par site, mais sont homogénéisées par rapport à la population totale des plantes sur le champ. De plus un décalage est observé entre les plantes et le sol.

Ce décalage peut être expliqué soit par la dégradation de la miliacine, soit par des effets liés à l'intégration temporelle de la miliacine dans le sol avec une élution plus en profondeur de la miliacine la plus ancienne.

1<sup>ère</sup> hypothèse : cette différence résulte d'une dégradation ou d'une contribution

L'appauvrissement en D observé qui consiste en un écart entre  $\delta D$  miliacine du sol par rapport au  $\delta D$  de la plante de -15 ‰ pourrait être comparé à celui qu'observent Chikaraishi et Naraoka (2006) pour les *n*-alcanes en  $C_{29}$  (-33 ‰) et en  $C_{31}$  (-57 ‰) entre la plante et le sol. Lorsqu'ils ont étudié ce transfert plante-sol des *n*-alcanes, Nguyen Tu et al. (2010) ont également observé une différence de  $\delta^{13}C$  qu'ils ont attribué à une contribution microbienne. On pourra d'ailleurs noter que dans l'étude de Chikaraishi et Naraoka (2006), tous les composés synthétisés via la voie acétogénique présentent un appauvrissement en D entre la plante et le sol alors que les composés synthétisés via les voies isopréniques (que ce soit MVA pour les stérols ou MEP pour le phytol) ne présentent aucune différence de composition isotopique entre le sol et la plante. Ceci pourrait donc confirmer l'hypothèse de la contribution microbienne, les composés synthétisés via les voies acétogéniques étant plus ubiquistes que ceux synthétisés via les voies isopréniques. Cependant, une contribution bactérienne ne pourrait pas expliquer la différence de composition isotopique entre la miliacine dans la plante et dans le sol. En effet, en plus d'être synthétisé via les voies isopréniques, aucun micro-organisme n'est réputé capable de produire de la miliacine. Le décalage observé pour le  $\delta D$  miliacine entre les plantes et le sol ne peut être expliqué par une contribution microbienne. De plus, la miliacine est considérée comme relativement stable vis-à-vis de la diagenèse microbienne (cf. Bossard et al., 2013), et de la dégradation photochimique (projet PalHydroMil, résultats non-publiés).

2<sup>ème</sup> hypothèse : La différence résulte de modalités d'intégration temporelle

L'échantillonnage du sol de Mézières a eu lieu en mars 2011 alors que l'article RCMS traite de la récolte de millet de 2009. Or la valeur  $\delta D$  miliacine moyenne pour le champ de Mézières en 2010, qui correspondrait à la miliacine présente en 2011, est de -132‰ V-SMOW au lieu de -122 ‰ en 2009.

Cette valeur de -132‰ V-SMOW dans la plante est égale à la valeur de -135.8‰ V-SMOW. On peut donc conclure que dans le sol du champ de Mézières, le  $\delta D$  miliacine enregistré est bien le  $\delta D$  miliacine des plantes de la culture précédente, mais aussi que ce signal persiste au moins 6 mois (de septembre à mars). De plus, il semblerait que le signal

des années précédentes soit dilué au cours du temps et qu'il ne reste donc que le signal de l'année immédiatement antérieure. On a travaillé là sur un champ cultivé, avec labourage, le signal des années bien antérieures a donc pu être dilué/dégradé ce qui expliquerait qu'on ne le retrouve pas.

### Synthèse

Pour conclure cette partie, on peut affirmer que

- la miliacine est spécifique de *Panicum miliaceum*.
- Une forte variabilité  $\delta D$  de la miliacine des graines de plantes peut être observée à l'échelle d'un champ (et donc, par extension, du bassin versant). Cependant la valeur moyenne du champ est représentative des conditions locales du fait de la répartition normale des valeurs de  $\delta D$ .
- La variabilité annuelle du  $\delta D$  des précipitations et/ou des conditions climatiques aériennes (humidité relative) est enregistrée par le  $\delta D$  miliacine mais selon une amplitude différente (15‰ en  $\delta D$  météorique pour 10‰ en  $\delta D$  miliacine, ou rôle de l'humidité relative ?) qui pourra être mis en vis-à-vis de ce qui est observé en conditions contrôlées.
- Le  $\delta D$  miliacine moyen dans le sol est identique au  $\delta D$  miliacine moyen des plantes de la culture immédiatement antérieure.
- Le signal archivé dans le sol semble persister au moins jusqu'à la culture suivante.
- L'intérêt d'utiliser un composé spécifique est que son signal ne pourra pas être dilué par la même molécule produite par un autre organisme et qu'il enregistrera des variations de conditions environnementales non révélées par des composés ubiquistes.





## CHAPITRE IV - CALIBRATION

### A. Fractionnement biosynthétique de deux variétés de *P. miliaceum* – Conditions contrôlées.

L'agriculture est la sélection et domestication d'espèces végétales sauvages propre à la consommation, que ce soit pour le bétail ou l'homme. Une fois la plante domestiquée, l'agriculture consiste en la sélection d'individus ayant des traits caractéristiques attrayant pour l'agriculteur et/ou le consommateur, ce qui entraînera une différenciation de l'espèce originelle en plusieurs sous-espèces ou variétés, la génération N+1 se rapprochant de ce que l'homme souhaite par rapport à la génération N (Darwin, 1859; Tanksley et McCouch, 1997). Cette différenciation pourra se faire d'un point de vue macroscopique, lorsqu'elle atteint, par exemple, la taille des graines, l'homme sélectionnant au cours des temps les graines les plus grosses afin d'améliorer le rendement énergétique (Tanksley et McCouch, 1997) mais aussi d'un point de vue moléculaire (Panaud, 2009). C'est cet aspect qui est traité dans cette partie car, qui dit molécules en quantités différentes, voire l'absence d'une molécule dans une variété par rapport à une autre variété, indique que les voies biosynthétiques exprimées peuvent être différentes d'une variété à une autre (Panaud, 2009). Cette sélection des céréales se retrouve dans toutes les espèces cultivées, depuis le riz jusqu'au millet (Panaud, 2009). Ainsi seront privilégiées, au cours du temps, les céréales aux graines de plus en plus claires et de plus en plus grosses (Panaud, 2009).

La calibration du  $\delta D$  de la miliacine a été réalisée sur une la variété "Sunrise" de *Panicum miliaceum*, qui est celle actuellement cultivée à Mézières-lez-Cléry. Mais pour que cette calibration puisse s'appliquer à la miliacine dérivant des graines de millet produites durant l'âge du Bronze (issues d'une variété évidemment différente), il est nécessaire de s'assurer qu'il n'existe pas de différence importante de fractionnement isotopique entre différentes variétés de *P. miliaceum*. La question est donc :

**Est-ce que les différentes variétés de millet *Panicum miliaceum* fractionnent de la même manière les isotopes de l'hydrogène lors de la synthèse de la miliacine ?**

Pour répondre à cette question, nous avons cultivé, dans les mêmes conditions, une variété "Black Seeds" qui est une variété rudérale se développant à l'heure actuelle comme plante adventice dans les cultures de maïs et qui correspond à une ancienne variété de millet cultivé (Poissonnier, 1994), et la variété "Sunrise" actuellement cultivée. Ces deux variétés se distinguent par une coloration différente des graines et des poids légèrement supérieurs pour la variété "Sunrise". Malgré ces différences d'aspect, les concentrations en miliacine sont similaires dans les deux plantes (cf. Chapitre III). Les deux variétés ont été cultivées dans une même chambre climatique (au laboratoire BIOEMCO), sur des solutions hydroponiques identiques, ce qui permet

d'assurer qu'elles ont bénéficié de conditions rigoureusement identiques (humidité,  $\delta D$  de la solution hydroponique, température...).

Le  $\delta D$  miliacine de la variété "*Black Seeds*" est de  $-145 \pm 3\text{‰}$  V-SMOW soit très proche de celui de la miliacine extraite de la variété "*Sunrise*" qui est de  $-150 \pm 2\text{‰}$  V-SMOW. Le  $\delta D$  de l'eau du collet de la variété "*Black Seeds*" est de  $-40\text{‰}$  V-SMOW alors que celui mesuré pour la variété "*Sunrise*" est de  $-41\text{‰}$  V-SMOW. Le fractionnement biosynthétique apparent<sup>1</sup> lié à la synthèse de la miliacine,  $\epsilon_{app}$  est, pour la variété "*Black Seeds*", de  $-109\text{‰}$  V-SMOW et pour la variété "*Sunrise*" de  $-114\text{‰}$  V-SMOW. Ce fractionnement biosynthétique apparent est donc quasi-identique dans les deux variétés. On peut considérer que la légère différence entre ces deux fractionnements apparents est due au trop faible nombre de réplicats pour la variété "*Sunrise*" qui ne s'était pas assez bien développée lors de la culture.

Cette démarche nous permet de penser que les deux variétés de millet fractionnent de la même façon. Ceci nous laisse à penser que les variétés plus anciennes de *Panicum miliaceum* fractionnaient de la même façon que la variété actuelle lors de la synthèse de la miliacine. Cette expérience n'est bien évidemment que préliminaire, mais tend à démontrer que le fractionnement biosynthétique, et donc certainement les voies biosynthétiques, de la miliacine sont identiques pour les différentes variétés de *Panicum miliaceum*.

---

<sup>1</sup> Pour rappel :  $\epsilon_{app} = 1000 [(\delta D_{mil} + 1000) / (\delta D_{HS} + 1000) - 1]$  où  $\epsilon_{app}$  est le fractionnement biosynthétique apparent,  $\delta D_{mil}$  le  $\delta D$  de la miliacine et  $\delta D_{SH}$  le  $\delta D$  de la solution hydroponique.

## B. Fractionnement biosynthétique d'une variété actuelle et d'une variété rudérale de *P. miliaceum* - Conditions naturelles

Des graines de *P. miliaceum* provenant de trois différents sites en Chine ont été gracieusement fournies par Xinyi Liu (Department of Archaeology, University of Cambridge). Ces sites sont répertoriés dans la Figure 52 et le Tableau 14.

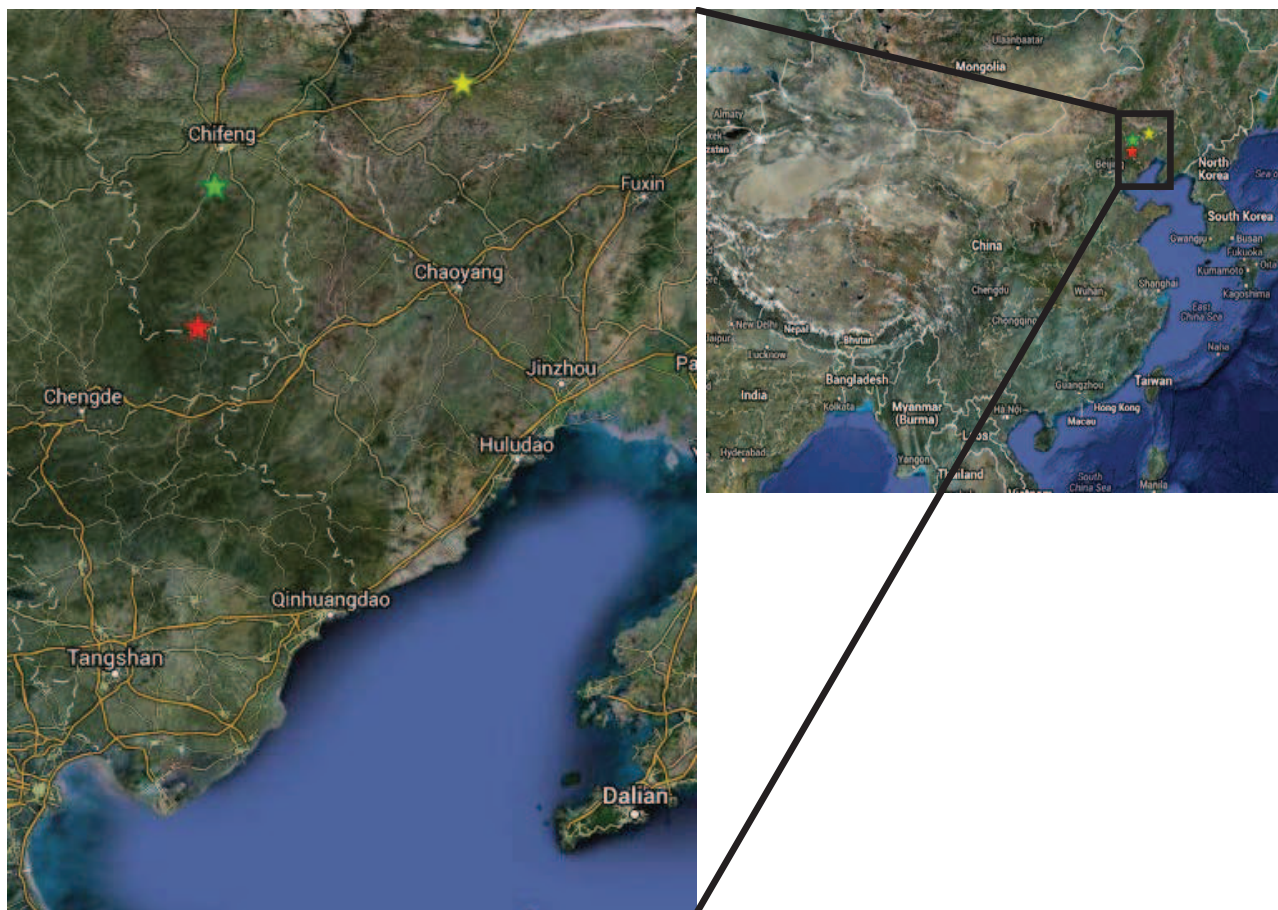


Figure 52 : Sites d'échantillonnage des deux variétés de millet *Panicum miliaceum* en Chine (image google map).

Ces sites sont localisés dans une province du nord-est de la Chine. Des graines de différents plants appartenant à la variété cultivée de *P. miliaceum* mais aussi à la variété rudérale (qui y poussait en tant que plante adventice) ont été prélevées. Les graines de cette variété rudérale sont anatomiquement très proches de celles de la variété rudérale *Black Seeds* qui ont été utilisées pour la culture en chambre climatique. Les graines prélevées provenaient de différents plants (entre 3 et 5) et, bien qu'il ne soit pas statistiquement comparable aux échantillonnages réalisés dans le champ de Mézières, le prélèvement aléatoire et en quantité suffisante (>50 dans notre cas) suffit à les rendre informatifs de la zone de récolte (Normes de la Régie des Marchés Alimentaires et Agricoles du Québec, 2010).

On observe dans le Tableau 14 que les valeurs  $\delta D$  miliacine sont identiques pour les deux variétés de millet. A noter également que les valeurs  $\delta D$  miliacine varient selon les sites de la même manière pour la variété cultivée et la variété rudérale.

**Tableau 14 : Valeurs  $\delta D$  miliacine (en‰ V-SMOW) de deux variétés de millet sur trois sites chinois.**

	Latitude	Longitude	Date	<i>Panicum miliaceum</i>			<i>Panicum miliaceum</i> rudéral		
			(jj-mm-aaaa)	$\delta D$ miliacine	Ecart-type	n	$\delta D$ miliacine	Ecart-type	n
Site A	41°23.635'	118°43.484' E	01-09-2007	-155	7	4	-152	8	5
Site B	42°04.378'	118°48.869' E	06-09-2007	-138	6	4	-140	3	4
Site C	42°34.349'	120°26.117' E	05-09-2007	-137	5	4	-138	5	3

La comparaison des valeurs  $\delta D$  miliacine entre ces deux variétés sur trois sites distincts permet donc de vérifier que deux variétés différentes de millet fractionnent les isotopes de l'hydrogène de la même façon lors de la synthèse de la miliacine, dans des conditions naturelles identiques.

Des expériences futures devront confirmer ces résultats en augmentant le nombre de variétés de millet étudiées. Par ailleurs, nous n'avons étudié dans ce travail que le fractionnement biosynthétique apparent. Il serait opportun de mesurer également le  $\delta D$  de l'eau foliaire des différentes variétés afin d'identifier des différences de fractionnement biosynthétique net<sup>1</sup>. Les stomates sont le premier contrôle de la composition isotopique l'eau foliaire (Gray, 2007) qui est celle utilisée pour la synthèse des composés organique. Leur nombre et taille est fonction de divers facteurs environnementaux mais aussi génétiques (Hetherington et Woodward, 2003). Ainsi, on peut penser qu'au fur et à mesure de la sélection, certaines espèces se soient retrouvées privilégiées dû à une résistance accrue, par exemple à la sécheresse. On pourra toutefois noter que le fait que le plantes en C4, dont fait partie le millet, sont décrites comme plus adaptées à des conditions environnementales difficiles (Chikaraishi et Naraoka, 2003, Chikaraishi et al., 2004a).

<sup>1</sup> Pour rappel :  $\epsilon_{net} = 1000 [(\delta D_{mil} + 1000) / (\delta D_{eau\ foliaire} + 1000) - 1]$  où  $\epsilon_{net}$  est le fractionnement biosynthétique net,  $\delta D_{mil}$  le  $\delta D$  de la miliacine et  $\delta D_{eau\ foliaire}$  le  $\delta D$  de l'eau foliaire.

### **C. Fractionnement des isotopes de l'hydrogène pendant la synthèse de lipides par *Panicum miliaceum*. Expériences en chambre climatique.**

Il semble qu'en milieu naturel le  $\delta D$  miliacine reflète des conditions hydrologiques locales, et que donc il variera lorsque les conditions hydrologiques changeront (voir la partie Pertinence). Afin de quantifier des changements hydrologiques, il est nécessaire d'évaluer l'impact qu'a chacun des paramètres hydrologiques sur le  $\delta D$  miliacine. Les principaux facteurs impactant le  $\delta D$  moléculaire sont le  $\delta D$  de l'eau météorique et l'humidité relative (Sachse et al., 2012). Dans une première partie, nous avons testé l'impact de ces deux facteurs. Dans une deuxième partie, nous testerons l'impact de la rétention en eau sur le  $\delta D$  miliacine.

Cette première partie fait l'objet d'un article en préparation pour *Geochimica et Cosmochimica Acta*. La version incluse dans ce manuscrit n'a pas encore été corrigée par les co-auteurs.

# Fractionation of hydrogen isotopes during lipid synthesis by *Panicum miliaceum*. Greenhouse experiments.

Nicolas Bossard<sup>a,b,c</sup>, Jérémy Jacob<sup>a,b,c</sup>, Thierry Bariac<sup>d</sup>, Philippe Biron<sup>d</sup>, Patricia Richard<sup>d</sup>, Claude Le Milbeau<sup>a,b,c</sup>, Valéry Terwilliger<sup>a,b,c,e,f</sup>, Elisabeth Vergès<sup>a,b,c</sup>.

<sup>a</sup> Univ d'Orléans, ISTO, UMR 7327, 45071, Orléans, France

<sup>b</sup> CNRS/INSU, ISTO, UMR 7327, 45071 Orléans, France

<sup>c</sup> BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Biogéochimie des Milieux Continentaux, UMR 7618 CNRS-UPMC-INRA, INRA-INAPG, Bâtiment EGER, 78850 Thiverval-Grignon, France

<sup>e</sup> LE STUDIUM®, Loire Valley Institute for Advanced Studies, 3D avenue de la Recherche Scientifique 45071, Orléans, France

<sup>f</sup> Department of Geography, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, USA

## 1. Résumé en français

Nous avons mesuré le  $\delta D$  de lipides (n-alcanes et miliacine, un triterpène pentacyclique) extraits de graines de plants *Panicum miliaceum* cultivés dans des conditions contrôlées. Les plantes ont été cultivées dans des solutions hydroponiques avec différents  $\delta D$  et dans deux conditions d'humidité. La mesure combinée du  $\delta D$  de l'eau extraite des organes transpirants et non transpirant et des lipides nous a permis de quantifier les fractionnements biosynthétiques nets et apparents lors de la synthèse des n-alcanes et de la miliacine. Le fractionnement biosynthétique net calculé pour les n-alcanes (moyenne de 150‰) et la miliacine (120‰) est en accord avec leurs voies biosynthétiques. Pour la gamme de  $\delta D$  de l'eau source, les valeurs  $\delta D$  de la miliacine et des n-alcanes sont fortement corrélés au  $\delta D$  de l'eau foliaire. La comparaison du fractionnement biosynthétique net pour les n-alcanes à longue chaîne et la miliacine à deux humidités différentes suggèrent que les valeurs  $\delta D$  de l'eau source et l'humidité relative peuvent être déconvoluées depuis les valeurs  $\delta D$  mesurées sur des composés synthétisés par des voies biosynthétiques différentes de compartiments cellulaires différents.

**Key words:** Fractionnement biosynthétique; isotopes de l'hydrogène; Millet; Chambres climatiques;  $\delta D$  moléculaire.

## 2. Abstract

We determined hydrogen isotope ratios ( $\delta D$ ) of lipids (n-alkanes and miliacin, a pentacyclic triterpene) extracted from *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) grown under controlled conditions. Plants were grown on hydroponic solutions with different  $\delta D$  values and at two different humidity levels. The combined determination of  $\delta D$  values of water extracted from transpirative and

non-transpirative organs and of lipids allowed us quantifying the apparent and net biosynthetic fractionation during the synthesis of miliacin and *n*-alkanes. The net biosynthetic fractionation obtained for *n*-alkanes (average 150‰) and miliacin (120‰) is in agreement with their respective biosynthetic pathways. Over the range of source water  $\delta D$  values, miliacin and *n*-alkanes  $\delta D$  values are strongly correlated to leaf wax  $\delta D$  values. The comparison of net biosynthetic fractionation for long chain *n*-alkanes and miliacin at two humidity levels suggests that source water  $\delta D$  values and relative humidity could be unraveled from  $\delta D$  values measurement on compounds synthesized through distinct pathways in different cells compartments.

**Key words:** Biosynthetic fractionation; hydrogen isotopes; Millet; Greenhouse chamber; compound-specific  $\delta D$ .



### 3. Introduction

Hydrogen isotope ratios ( $\delta D$ ) of lipids synthesized by autotrophs and archived in lacustrine sediments are increasingly used to reconstruct past climate (i.e. Sachse et al., 2012). These lipids derive from the accumulation over time of various compounds produced by different plants once living in the catchment and then transported and preserved in sediments. When conditions are favorable, the isotope ratios of C-bound hydrogen atoms are preserved over geological scale (Yang and Huang, 2003). The rationale for using the  $\delta D$  values of these compounds to reconstruct past climatic conditions is that the hydrogen isotopic composition of individual molecules synthesized by plants and algae records the climatic conditions that prevailed at the time of their biosynthesis (Sessions et al., 1999; Sauer et al., 2001; Huang et al., 2002; Gleixner and Mugler, 2007).

The relationship between precipitation water  $\delta D$  values and climatic variables has been known for long (Dansgaard, 1964). If precipitation waters are directly used for the synthesis of organic biochemicals, their  $\delta D$  values are only dependent on the  $\delta D$  values of precipitation waters and can be used as a quantitative indicator of climate variability (i.e. Gleixner and Mugler, 2007; Sachse et al., 2012).

Additional/secondary factors can affect the  $\delta D$  values of organic compounds during their biosynthesis. These factors introduce biases into the direct relationship between precipitation water  $\delta D$  values and  $\delta D$  values of organic compounds but can also be viewed as a source of additional information on past environmental conditions. In order to quantitatively reconstruct past climate variations, an understanding of the intimate relationships between compound-specific  $\delta D$  values and their controlling environmental factors is necessary.

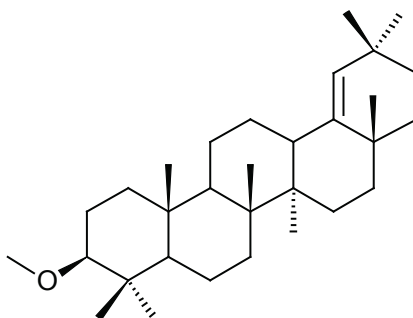
The source water of land plants can be subjected to evaporation in soils and to transpiration. These two parameters are highly dependent on different climatic factors such as the soil moisture or air temperature. The  $\delta D$  values of lipids synthesized by terrestrial higher plants thus integrates the  $\delta D$  values of precipitation, but also other climatic factors, such as humidity and soil evaporation (Gleixner and Mugler, 2007; Sachse et al., 2012).

After the soil water  $\delta D$  values, the foliar water  $\delta D$  values are under control of different factors such as humidity and water use efficiency (Hou et al., 2007a,b; Douglas et al., 2012). There is still some debate about the main factors driving the  $\delta D$  values of compounds due to their biosynthesis location of biosynthesis and the different pool of available hydrogen (Zhou et al., 2010; Feakins et al., 2010; McInerney et al., 2011). This hydrogen pool could be, in some case, insensitive to transpiration (McInerney et al., 2011; Zhou et al., 2010). This is the reason why the quantification of relationships between individual molecules  $\delta D$  values and various environmental parameters must be hierarchized with respect to their respective importance. This can be achieved through the analysis of leaf wax  $\delta D$  values over natural gradients (i.e. Huang et al., 2002; Sachse



et al., 2004; Sachse et al., 2006; Jia et al., 2008; Feakins et al., 2010; Bai et al., 2011; Douglas et al., 2012; Garcin et al., 2012; Kahmen et al., 2013a). More recent studies involved the cultivation of selected plants under controlled conditions (i.e. Zhou et al., 2011; Kahmen et al., 2013b). These calibration studies confirmed that the  $\delta D$  value of the plant source water is the predominant factor controlling compound-specific  $\delta D$  values, they also permitted a better understanding of the impacts of other variables with the promises of obtaining more quantitative information from compound-specific  $\delta D$  measurements (Chikaraishi and Narakoa, 2003; Hou et al., 2008; Sachse et al., 2006; Smith et Freeman, 2006).

It is worthwhile noting that most of these studies analysed *n*-alkyl lipids (*n*-alkanes, fatty acids) that are not reputed to be specific of a given taxa. Hence, these compounds, when found in sediments, can derive from a large set of potential producers, each producing a large panel of  $\delta D$  values for a given compound within a given context (Hou et al., 2007a; Liu and Yang, 2008). Considering that multiple controls have been invoked for explaining discrepancies between  $\delta D$  values of *n*-alkyl (lifeform, vegetation type, type of metabolism...) (Hou et al., 2007a; Smith and Freeman, 2006; Polissar and Freeman, 2010), there is a urgent need for analyzing compounds susceptible of being archived in sediments and for which the source can be constrained.



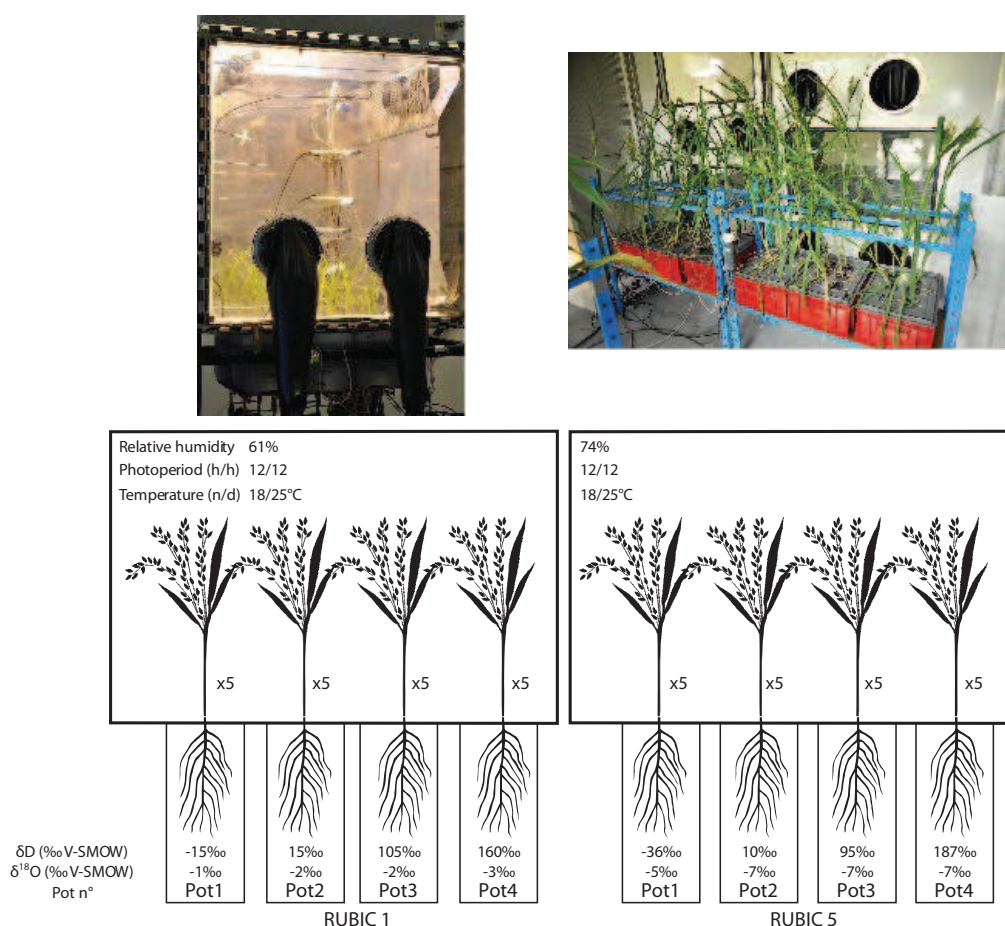
**Figure 53 : Structure of miliacin.**

We recently reported that miliacin (olean-18-en-3 $\beta$ -ol ME; Figure 53) found in the sediments of lake Le Bourget (French Alps) dated back to the Bronze Age is a specific biomarker of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) that was grown in the catchment at that time (Jacob et al., 2008a,b; 2009). This specificity confers sedimentary miliacin, and its  $\delta D$  values, a unique opportunity to finely reconstruct the climatic conditions that prevailed during the Bronze Age in the Alps (and wherever sedimentary miliacin attests to millet cultivation). In order to quantify these relationships between miliacin  $\delta D$  values and their controlling environmental parameters and to, more generally, bring information on the key parameters that affect the  $\delta D$  values of plant lipids, we have grown millet plants in climatically controlled chambers under various stresses.

## 4. Material and Methods

### a) Experimental design

We quantified the impacts of two factors that supposedly modify the  $\delta D$  values of plant lipids during biosynthesis: source water  $\delta D$  values and relative humidity. Two climate-controlled growth chambers (Rubic1 and Rubic5) were used for this experiment. Their volume is  $0.5\text{m}^3$  for Rubic1 and  $9\text{m}^3$  for Rubic5 (Figure 54). Plants were cultivated in these climatic chambers with constant parameters. The conditions were exactly the same in the two chambers: a photoperiod 12:12, a temperature set at  $18^\circ\text{C}$  (night) and  $25^\circ\text{C}$  (day), and a slow wind speed to homogenate the room. Only relative humidity was different between experiments: 61% in Rubic1, 74% in Rubic5. Twenty plants were germinated on vermiculite from seeds (provided by Mr. Seguin, Mézières-lez-Cléry, France) and then 5 plants were grown over 4 different  $\delta D$  values of water in the hydroponic solutions (HS) prepared with stock solutions of  $\text{D}_2\text{O}$  and of tap water at  $-50\text{‰}$  V-SMOW. The expected values of these hydroponic solutions were:  $-50\text{‰}$  for Pot 1,  $0\text{‰}$  for Pot 2,  $100\text{‰}$  for Pot 3 and  $200\text{‰}$  V-SMOW for Pot 4 (see Section 5/a/1 for measured values).



**Figure 54 : Experimental design.  $\delta D$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values of the hydroponic solution are those measured and reported in Section 3.2.1.**

### **b) Water $\delta D$ and $\delta^{18}O$ analyses**

Water was extracted from green plants one week before sampling seeds at maturity in order. Different organs of plants were separated (roots, collet which correspond to the first internode, internodes, nodes, leaves and panicles) for water analyses. The  $\delta D$  and  $\delta^{18}O$  values of water extracted from plant organs were determined after cryogenic distillation for  $\delta^{18}O$  on an IRMS (Isoprime) coupled to an Aquaprep and for  $\delta D$  on an IRMS PyrOH (Isoprime) coupled to an elemental analyser Eurovector. HS were collected at different times and analyzed with the same device.

### **c) Extraction and purification of compounds**

Plants were collected at harvest time in order to analyse the molecular contents of the seeds. For each plant, about 40 seeds of the main particle were ground to powder and weighed. Lipids were ultrasonically extracted three times with organic solvents (dichloromethane / isopropanol 2:1). The lipids extracts were combined and dried under nitrogen. The total extract was separated into neutral, acidic and polar fractions by ion exchange chromatography on an aminopropyl-bounded silica column. The different classes of compounds (*n*-alkanes and miliacin) were purified from the neutral fraction by flash chromatography on activated silica by using solvents of increasing polarity. Aliphatic hydrocarbons such as *n*-alkanes were first eluted with 2mL of heptane, then aromatic hydrocarbons were eluted with heptane:toluene 2:1. Miliacin was eluted with 2mL hexane:toluene (1:1) and 2mL hexane/ethyl acetate (19:1). The different fractions were dried under nitrogen and stored at 4°C until analysis by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (GC-irMS). 5 $\alpha$ -cholestane was added prior to analysis by GC-MS for quantification.

### **d) Compound quantitation and purity assessment**

The abundance and purity of the different compounds were assessed by GC-MS on a Trace gas chromatograph coupled to a Polaris GCQ ion trap mass spectrometer (both from Thermo Scientific, Bremen, Germany) according to previously described method (Jacob et al., 2005). The gas chromatograph was fitted with an Rtx-5 MS capillary column (5m column guard, 30m, 0.25mm i.d., 0.25 $\mu$ m film thickness; Restek, Bellefonte, PA, USA). The temperature of the column was held at 40°C for 1mn, and then increased from 40 to 300°C at 20°C.min<sup>-1</sup>, with a final isothermal hold at 300°C for 30min. The sample was dissolved in toluene and injected splitless in a 2 $\mu$ l volume with injector temperature set at 280°C. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.4ml.min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated in the electron ionization (EI) mode at 70 eV ionization energy and scanned from *m/z* 50 to 650.

### e) Compound-specific $\delta D$ measurements

$\delta D$  values were determined on a TraceGC chromatograph equipped with a Triplus Autosampler coupled to a DeltaV Advantage isotope ratio mass spectrometer through a GC-Isolink interface and a Conflo IV dilution system (all from Thermo Scientific). The chromatographic conditions were the same as those used in the GC-MS experiments, except that the GC column (J&W DB5, 30m, 0.25mm i.d., 0.25 $\mu$ m film thickness; Agilent, Palo Alto, CA, USA) was slightly different. 1 $\mu$ l of the sample dissolved in toluene was injected at least 3 times. A standard constituted by 1 $\mu$ l of a mixture of 15 *n*-alkanes (*n*-C<sub>16</sub> to *n*-C<sub>30</sub>) with  $\delta D$  values ranging from -46.3 to -242.3‰ determined off-line (A. Schimmelmann, Indiana University, USA) was used to calibrate reference gas prior to analyses. Then, lipids  $\delta D$  values were normalized to the V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) isotopic scale using the reference gas  $\delta D$  value. The mixture of *n*-alkanes was routinely injected to check the  $\delta D$  values of the reference gas each 3 samples. Measured  $\delta D$  values for the *n*-alkanes mixture are in good agreement with those measured off-line ( $r^2 = 0.99$ ). The overall precision for the *n*-alkanes standard reaches 6‰. Our samples were at least injected three times until the precision reaches 6‰. Replicates were injected randomly in order to ensure the reproducibility was dependent of experimental conditions. All isotopic values are expressed in‰ V-SMOW.

## 5. Results

### a) Water $\delta D$ and $\delta^{18}O$ values

#### *(1) Water $\delta D$ and $\delta^{18}O$ values of the hydroponic solution*

$\delta D$  and  $\delta^{18}O$  values of water in the HS used for the experiments were as follow (Table 1; expected values in brackets): Rubic1: -15 (50); 15 (0); 105 (100); 160 (200)‰ for  $\delta D$  values and -1.09, -2.24, -2.44 and -3.45 for  $\delta^{18}O$  values in Pots 1, 2, 3 and 4; Rubic5: -36 (50); -10 (0); 95 (100); 187 (200)‰ for  $\delta D$  values and -4.84, -6.58, -6.58, -6.79 for  $\delta^{18}O$  values in Pots 1, 2, 3 and 4. This constitutes a range of 170‰ for  $\delta D$  values in Rubic1 and 220‰ for Rubic5. In the following, results will be listed by using the same order: Rubic1 Pots 1, 2, 3 and 4 and Rubic5 Pots 1, 2, 3 and 4. To note, there is a slight increase in  $\delta^{18}O$  values with increasing  $\delta D$  values probably due to higher  $\delta^{18}O$  values of D<sub>2</sub>O when compared to tap water used for the preparation of stock solutions.

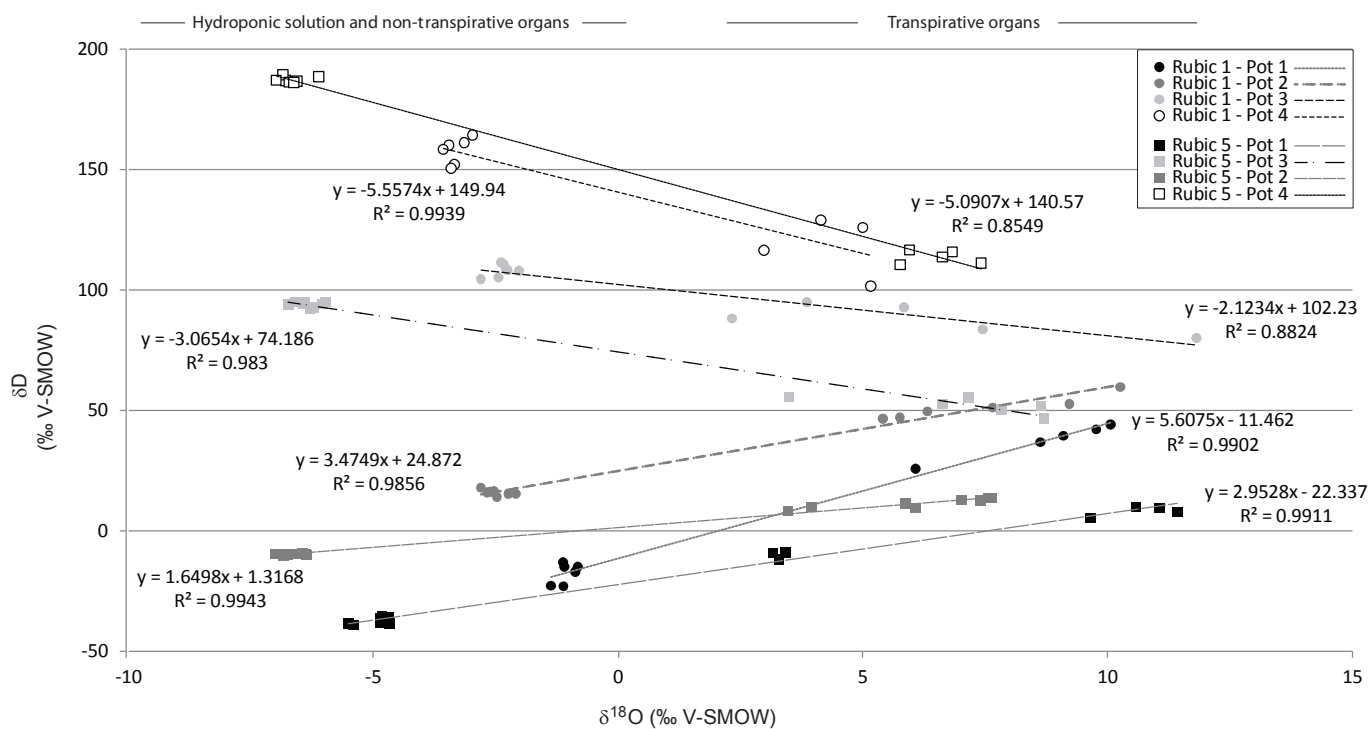


Figure 55 : Water  $\delta D$  values in different organs along an increasing hydroponic solution  $\delta D$ .

**Tableau 15:  $\delta D$  and  $\delta^{18}O$  values of water in the hydroponic solution and in transpirative and non-transpirative organs during experiments in Rubic1 and Rubic5. HS=hydroponic solution; R=roots; LX=leaf X (Leaves are numbered from bottom to top); C=first internode / collet; IN LX=internode between leaf X-1 and leaf X; P=panicle.**

Rubic1		$\delta^{18}O$ (‰ V-SMOW)	$\delta D$ (‰ V-SMOW)	Rubic5		$\delta^{18}O$ (‰ V-SMOW)	$\delta D$ (‰ V-SMOW)
Rubic1 - Pot 1	HS	-1	-15	Rubic5 - Pot 1	HS	-5	-36
	R	-1	-23		R	-5	-38
	C	-1	-23		C	-5	-37
	IN L5	-1	-15		IN L6	-5	-36
	IN L6	-1	-13		IN L7	-5	-35
	IN L7	-1	-17		IN L8	-5	-38
					IN L9	-5	-38
					IN L10	-6	-39
					IN L11	-5	-39
					L6	3	-12
Rubic1 - Pot 2	L5	9	39	Rubic5 - Pot 2	L7	3	-9
	L6	9	37		L8	10	5
	L7	10	42		L9	11	10
	L8	10	44		L10	11	8
					L11	11	9
	P	6	26		P	3	-9
	HS	-2	15		HS	-7	-10
	R	-3	16		R	-6	-10
	C	-2	15		C	-6	-9
	IN L5	-2	14		IN L7	-7	-10
Rubic1 - Pot 3	IN L6	-3	18		IN L8	-6	-10
	IN L7	-3	16		IN L10	-7	-10
	IN L8	-3	16		IN L11	-7	-9
					IN L12	-7	-10
	L5	5	47		L6	6	11
	L6	6	50		L7	6	10
	L7	6	47		L9	8	14
	L8	10	60		L10	7	13
	L9	9	53		L11	8	14
	P	8	51		L12	7	13
Rubic1 - Pot 4	P1	4	10	Rubic5 - Pot 3	P2	3	8
	HS	-2	105		HS	-7	95
	R	-2	108		R	-6	94
	C	-3	104		C	-6	95
	IN L5	-2	108		IN L6	-6	94
	IN L6	-2	111		IN L7	-6	95
	IN L7	-2	109		IN L8	-6	92
	IN L8	-2	111		IN L9	-7	94
					IN L10	-6	93
	L4	4	95		L6	7	52
Rubic1 - Pot 5	L5	6	93	Rubic5 - Pot 4	L7	7	55
	L6	2	88		L8	8	51
	L7	12	80		L9	9	52
					L10	9	47
	P	7	84		P	4	55
	HS	-3	160		HS	-7	187
	R	-3	161		R	-6	188
	C	-3	164		C	-7	187
	IN L5	-4	158		IN L6	-7	187
	IN L6	-3	152		IN L7	-7	189
Rubic1 - Pot 6	IN L7	-3	151		IN L8	-7	187
					IN L9	-7	186
					IN L10	-7	186
	L4	3	116		L5	7	116
	L5	5	126		L8	7	114
	L6	4	129		L11	7	111
	P	5	102		P1	6	110
					P2	6	117

## (2) Water $\delta D$ and $\delta^{18}O$ values of non transpirative organs

Water  $\delta D$  values of organs such as roots, nodes and internodes, range from -23 to +164‰ V-SMOW in Rubic1 and from -39 to +189‰ V-SMOW in Rubic5 (Table 15). Those values are in good agreement with values obtain from HS: For Rubic1: from -22 to -13‰ for an HS at -15‰; from 14 to 18‰ for an HS at 15‰, from 104 to 109‰ for an hydroponic solution at 105‰, from 150 to 164‰ for an HS at 160‰; and for Rubic5: from -39 to -35‰ for an HS at -36‰; from -10 to -9‰ for an HS at -9‰, from 92 to 95‰ for an HS at 95‰, from 186 to 189‰ for an HS at 187‰.

Water  $\delta^{18}O$  values in those organs are also very close to the  $\delta^{18}O$  values of water in the corresponding HS. For the HS of which the  $\delta^{18}O$  of water is -1.1‰ in Rubic1,  $\delta^{18}O$  values of water in organs range from -1.4 to -0.8‰; for -2.2‰, it ranges from -2.8 to -2.1‰; for -2.4‰, from -2.8 to -2‰; for -3.4‰, from -3.6 to -3‰. In Rubic5, the  $\delta^{18}O$  values water in organs are as follows: for an

HS at -4.8‰, from -5.5 to -4.7‰; for -6.6‰ ( $\delta D$  at -9.5‰), from -7 to -6.4‰; for -6.6‰ ( $\delta D$  at 95‰), from -6.7 to -6‰; for -6.8‰, from -7 to -6.1‰.

### (3) Water $\delta D$ and $\delta^{18}O$ values of transpirative organs

The  $\delta D$  values of water extracted from panicles and leaves range from 26 to 129‰ V-SMOW in Rubic1, and from -9 to +117‰ V-SMOW in Rubic5 (Table 15). Water in the transpirative organs is thus enriched in deuterium when compared to the HS when the HS is depleted, whereas water  $\delta D$  values of leaves are depleted in deuterium compared to source water when deuterium content of HS is very high. The  $\delta^{18}O$  values of the water of those organs are systematically enriched compared to the HS  $\delta^{18}O$  values.

#### b) Lipid $\delta D$ values

The most abundant lipids synthesized by *Panicum miliaceum* L. and present in the seeds were analysed. They are  $n\text{-C}_{25}$ ,  $n\text{-C}_{27}$ ,  $n\text{-C}_{31}$  and  $n\text{-C}_{33}$  alkanes and miliacin.  $\delta D$  values of  $n\text{-C}_{29}$  were not measured due to coelution with 5 $\alpha$ -cholestane, used as quantitation standard.  $\delta D$  values of miliacin and  $n$ -alkanes are reported together with those of the HS in Table 16.

#### a) Miliacin $\delta D$ values

Miliacin  $\delta D$  values range from -77 to -17‰ for Rubic1 and from -122 to -31‰ V-SMOW for Rubic5 (Table 16). This constitutes a range of 60‰ for Rubic1 and of 91‰ for Rubic5.

#### b) $n$ -alkanes $\delta D$ values

Four compounds were analysed due to their high abundance, the  $n\text{-C}_{25}$  alkane, the  $n\text{-C}_{27}$  alkane, the  $n\text{-C}_{31}$  alkane and the  $n\text{-C}_{33}$  alkane. Their  $\delta D$  values ranges from -180 to -30‰ V-SMOW (Table 16). All these compounds have  $\delta D$  values increasing with increasing deuterium enrichment of the HS and of leaf water.

**Tableau 16:  $\delta D$  values of miliacin and  $n$ -alkanes extracted from *P. miliaceum* seeds collected after cultivation in Rubic1 and Rubic5 climatic chambers.**

	Hydroponic solution	Miliacin $\delta D$			$n$ -C <sub>25</sub> alkane $\delta D$			$n$ -C <sub>27</sub> alkane $\delta D$			$n$ -C <sub>31</sub> alkane $\delta D$			$n$ -C <sub>33</sub> alkane $\delta D$		
	(‰ V-SMOW )	(‰ V-SMOW)	Stdev	n	(‰ V-SMOW)	Stdev	n	(‰ V-SMOW)	Stdev	n	(‰ V-SMOW)	Stdev	n	(‰ V-SMOW)	Stdev	n
Rubic1	-15	-77	6	3	-119		1	-96		1	-97		1	-102		1
	15	-61		1	-99		1	-128		1	-83		1	-78		1
	105	-34	1	2	-83	12	2	-81	0	2	-70	18	2	-54	10	2
	160	-18		1	-59		1	-57		1	-32		1	-31		1
Rubic5	-36	-122	7	3	-155	2	2	-170	6	3	-160	3	3	-179	14	3
	-10	-109	2	2	-134		1	-161		1	-140		1	-133		1
	95	-80	7	2	-98		1	-105		1	-108		1	-98		1
	187	-31	1	3	-61	10	2	-66	1	2	-71	11	2	-70	2	2



## 6. Discussion

### a) Water uptake and transpiration

#### (1) Water uptake

The  $\delta D$  values of water from organs such as roots, nodes and internodes, are the same that the source water  $\delta D$  values (i.e. the regression line has a 1:1 slope in Figure 4 for Rubic 5), whatever the HS water  $\delta D$  values (Table 15 and 16). The same applies for  $\delta^{18}O$  (Figure 56). This is consistent with previous studies that showed that, except for plants living in extreme environments and/or displaying stomata on stems (Ellsworth and Williams, 2007; Lin and Sternberg, 1993) – which is not the case for *P. miliaceum* –,  $\delta D$  values of water in non-transpirative organs (roots, nodes, internodes) are the same as that of source water (Dawson and Ehleringer, 1991; Bariac et al., 1994a,b; Gleixner and Mugler, 2007; Sachse et al., 2006). Our study thus confirms that there is no discernible isotopic fractionation during water uptake.

#### (2) Transpiration

$\delta D$  (and  $\delta^{18}O$ ) values of the water extracted from transpirative organs (leaves and panicles) are systematically different from  $\delta D$  (and  $\delta^{18}O$ ) values of the hydroponic solution (Figure 55). When the hydroponic solution is depleted in D, water in transpirative organs is enriched in D. Reversely, when the hydroponic solution is enriched in D, water in transpirative organs appears depleted in D (Figure 55). These differences can be explained by isotopic fractionation during transpiration. For low hydroponic solution  $\delta D$  values, water enrichment in transpirative organs is due to the preferential transpiration of  $H_2O$  compared to  $HDO$  (Santrucek et al., 2007). For high hydroponic solution  $\delta D$  values, the reverse occurs with preferential transpiration of  $HDO$  compared to  $H_2O$ , due to the Péclet effect (i.e. Shu et al., 2008). Because the range of  $\delta^{18}O$  values of the hydroponic solution is more constrained than that of  $\delta D$  values, we do not observe this effect, but only enrichment in  $^{18}O$  between the hydroponic solution and water in transpirative organs due to transpiration (Figure 55).

Apart from these general considerations, some minor differences could be observed between organs. A gradient in leaf water enrichment (both for D and  $^{18}O$ ) can be observed with lower enrichment for lower (and senescent) leaves, which exhibit an intermediate behaviour between non-transpirative and fully transpirative leaves (Figure 55). Water extracted from panicles also shows an enrichment in both D and  $^{18}O$  that is close to that of transpirative organs (Figure 55). As a matter of fact, panicles can be considered as transpirative organs due to the presence of glumes, which are photosynthetically active and subject to transpiration (Lu and Lu, 2004; Zhang et al., 2008). As for leaves, some values tend towards those of non-transpirative organs. This can result from the sampling of panicles since the water of the supporting stem (non-transpirative) was collected with that of seeds. This can also result from the senescence of glumes that thus lose their transpirative ability.

Because we used HS protected from evaporation, only transpiration can be invoked as the controlling factor of D and  $^{18}\text{O}$  enrichment in leaves. Transpirative rates of *P. miliaceum* can be calculated from the evolution of  $\delta\text{D}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values from water in HS to water in transpirative organs in each pot (Figure 55). For each experiment, all rates point to a virtual single  $\delta\text{D} / \delta^{18}\text{O}$  couple of values that corresponds to the expected isotopic composition of water vapour in Rubic 1 and Rubic 5. Although we were unable to measure the isotopic composition of water vapour, the convergence of transpirative rates towards a unique point (for each climatic chamber) indicates that the chamber was at equilibrium during our experiment.

### **b) Apparent and net biosynthetic fractionations**

All lipids (*n*-alkanes and miliacin) are systematically depleted in deuterium compared to the HS and to leaf water (Table 16). This common feature is explained by the preferential selection of hydrogen compared to deuterium during biosynthesis, as a result of high NADPH selectivity towards deuterium (Chikaraishi et al., 2009; Schmidt et al., 2001). The difference of  $\delta\text{D}$  values between lipid compounds and HS is defined as the apparent biosynthetic fractionation, whereas the real (or net) biosynthetic fractionation refers as the difference of  $\delta\text{D}$  values between lipid compounds and leaf water (Kahmen et al., 2013b; Chikaraishi et al., 2009; Gleixner and Mugler, 2007).

Here, apparent biosynthetic fractionation is defined as (Chikaraishi and Narakoa 2003; Sessions et al., 1999):

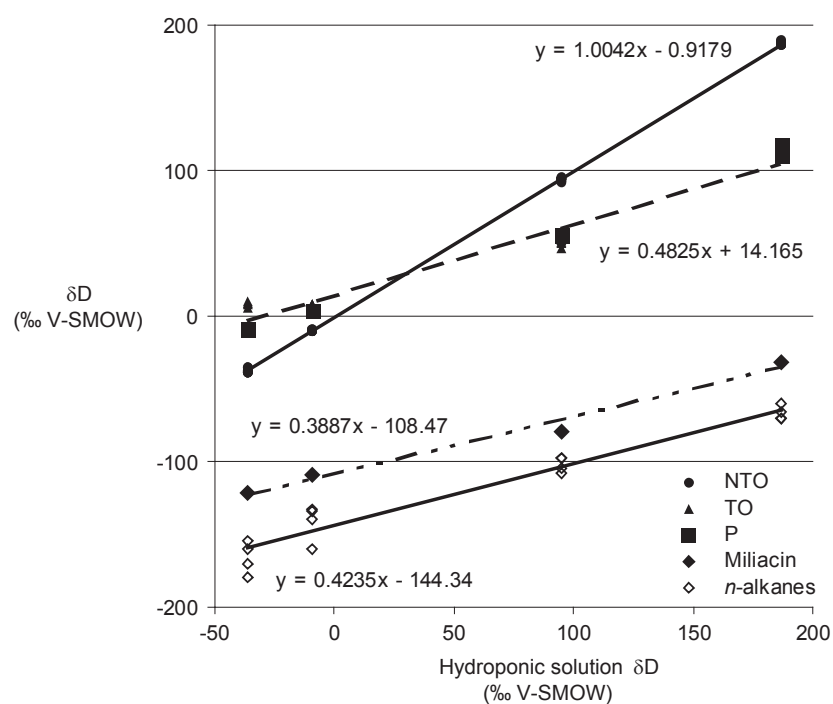
#### **Équation 1**

$$\epsilon_{\text{app}} = 1000 [(\delta\text{D compound} + 1000) / (\delta\text{D HS} + 1000) - 1]$$

and net biosynthetic fractionation as:

#### **Équation 2**

$$\epsilon_{\text{net}} = 1000 [(\delta\text{D compound} + 1000) / (\delta\text{D leaf water} + 1000) - 1]$$



**Figure 56 :  $\delta D$  values of non-transpirative organs (NTO), transpirative organs (TO and panicles – P), of miliacin and n-alkanes versus  $\delta D$  values of the hydroponic solution in Rubic 5.**

**Tableau 17: Apparent ( $\epsilon_{\text{app}}$ ) and net ( $\epsilon_{\text{net}}$ ) biosynthetic fractionation for miliacin and *n*-alkanes, calculated from equation 1 and equation 2, in Rubic 1 (61 % relative humidity) and Rubic 5 (74 % relative humidity). Biosynthetic fractionations are calculated from panicles water (PW; see Table 1)  $\delta\text{D}$  values since it is supposed to be the water from which *n*-alkanes and miliacin were produced in seeds.**

	HS $\delta\text{D}$	$\epsilon_{\text{app}}$ (‰)					PW $\delta\text{D}$	$\epsilon_{\text{net}}$ (‰)				
	(‰ V-SMOW)	Miliacin	<i>n</i> -C <sub>25</sub>	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	<i>n</i> -C <sub>31</sub>	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	(‰ V-SMOW)	Miliacin	<i>n</i> -C <sub>25</sub>	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	<i>n</i> -C <sub>31</sub>	<i>n</i> -C <sub>33</sub>
Rubic1	-15	-63	-106	-82	-83	-88	26	-100	-141	-119	-120	-125
	15	-75	-112	-141	-97	-92	51	-107	-143	-170	-127	-123
	105	-126	-170	-168	-158	-144	84	-109	-154	-152	-142	-127
	160	-153	-189	-187	-166	-165	102	-109	-146	-144	-122	-121
	Average	-104	-144	-144	-126	-122	Average	-106	-146	-146	-127	-124
Rubic5	-36	-89	-123	-139	-129	-148	-9	-114	-147	-162	-152	-172
	-10	-100	-125	-153	-131	-124	9	-117	-142	-168	-148	-141
	95	-160	-176	-183	-185	-176	55	-128	-145	-152	-155	-145
	187	-184	-209	-213	-217	-217	113	-129	-156	-161	-165	-164
	Average	-133	-158	-172	-165	-166	Average	-122	-147	-160	-155	-155
	Stdev	46	42	33	43	40	Stdev	8	6	7	15	15

### (1) *n*-alkanes

As discussed earlier, the isotopic composition of leaf water differs from that of non-transpirative organs (and consequently of HS) due to transpiration. Thus, whereas the relationship between HS  $\delta D$  values and non-transpirative organs  $\delta D$  values is close to 1, it is only of 0.48 for leaf water (Figure 56).

The range of apparent biosynthetic fractionation ( $\epsilon_{app}$ ) between *n*-alkanes and HS  $\delta D$  values is highly variable with  $-151 \pm 39\text{‰}$  for *n*-C<sub>25</sub>,  $-158 \pm 40\text{‰}$  for *n*-C<sub>27</sub>,  $-146 \pm 45\text{‰}$  for *n*-C<sub>31</sub>, and  $-144 \pm 43\text{‰}$  for *n*-C<sub>33</sub> (Table 17), due to the deviation of leaf water  $\delta D$  values from HS  $\delta D$  values, attributed to transpiration. If we only consider the most “natural” conditions (with HS  $\delta D$  values at -15 for Rubic1 and -36 and -10‰ for Rubic 5),  $\epsilon_{app}$  are  $-118 \pm 11\text{‰}$  for *n*-C<sub>25</sub>,  $-125 \pm 37\text{‰}$  for *n*-C<sub>27</sub>,  $-114 \pm 27\text{‰}$  for *n*-C<sub>31</sub>, and  $-120 \pm 30\text{‰}$  for *n*-C<sub>33</sub>.

$\epsilon_{app}$  between *n*-alkanes and growth water was -158 and -162‰ for *Zostera marina* and *Spartina alterniflora*, respectively (marsh grasses; Sessions et al., 1999; Sessions, 2006). For terrestrial plants, several authors reported  $\epsilon_{app}$  from -80 to -206 (Sachse et al., 2006, 2009; Hou et al., 2007b; Feakins and Sessions 2010; Garcin et al., 2012; Tipple et al., 2013; Kahmen et al., 2011). Focusing on C3 grasses, Sachse et al. (2010) and Kahmen et al. (2013b) reported  $\epsilon_{app}$  from -22 to -175‰. Focusing on C4 plants, Chikaraishi and Naraoka (2003) reported  $\epsilon_{app}$  values of  $-132 \pm 12\text{‰}$  for *n*-alkanes, whereas McInerney et al. (2011) found  $\epsilon_{app} = -135 \pm 15\text{‰}$  for *n*-C<sub>29</sub> alkane. Similarly, Chikaraishi et al. (2004) found  $\epsilon_{app}$  values ranging from ca. -100 to -140‰ for C4 plants and Smith and Freeman (2006) found  $\epsilon_{app}$  for *n*-C<sub>29</sub> of  $-140\text{‰} \pm 15$  for C4 grasses. In the literature, only Smith and Freeman (2006) calculated  $\epsilon_{app}$  for *Panicum* species (*P. virgatum*:  $\epsilon_{app} = -151\text{‰}$ ). Therefore, our  $\epsilon_{app}$  for *n*-alkanes produced by *P. miliaceum* is consistent with ranges published in the literature.

At first order,  $\delta D$  values of *n*-alkanes correlates with  $\delta D$  values of leaf water, with rather homogeneous net biosynthetic fractionations ( $\epsilon_{net}$ ) of  $-147 \pm 6\text{‰}$  for *n*-C<sub>25</sub>,  $-154 \pm 17\text{‰}$  for *n*-C<sub>27</sub>,  $-141 \pm 17\text{‰}$  for *n*-C<sub>31</sub>, and  $-140 \pm 20\text{‰}$  for *n*-C<sub>33</sub> (when both Rubic1 and Rubic5 are considered; Table 17 and Figure 56). This is consistent with  $\delta D$  values of biochemicals being more reflective of leaf water  $\delta D$  values (Kahmen et al., 2013b; Sachse et al., 2010).

Our  $\epsilon_{\text{net}}$  values also fall within the range of values reported by other authors. Feakins and Sessions (2010) reported  $\epsilon_{\text{net}}$  of  $-147 \pm 18\text{‰}$  for an entire ecosystem. Sessions et al. (1999) reported  $\epsilon_{\text{net}}$  of  $-158$  and  $-162\text{‰}$  for aquatic plants (respectively *Zostera marina* and *Spartina alterniflora*). For trees,  $\epsilon_{\text{net}}$  range from  $-120$  to  $-170\text{‰}$  (Sachse et al., 2009; Tipple et al., 2013; Kahmen et al., 2011). For C4 plants, Zhou et al. (2010) and Smith and Freeman (2006) reported  $\epsilon_{\text{net}}$  of  $-180$  and  $-150\text{‰}$  (the difference being attributed to temperature) and  $-157\text{‰}$ , respectively. It is worthwhile noting that the range of  $\epsilon_{\text{net}}$  for *n*-alkanes is narrower than that of  $\epsilon_{\text{app}}$  and independent of the plant type. Our study provides the first values for *n*-alkanes  $\epsilon_{\text{net}}$  in *Panicum miliaceum*.

## (2) Miliacin

As for *n*-alkanes, miliacin  $\delta\text{D}$  values parallel that of leaf water  $\delta\text{D}$  values with a rather homogeneous  $\epsilon_{\text{net}}$  of  $-114 \pm 10\text{‰}$  (Table 17 and Figure 56). Reversely, miliacin  $\delta\text{D}$  values diverge from HS  $\delta\text{D}$  values as exhibited by an elevated standard deviation ( $44\text{‰}$ ) around an average value of  $-119\text{‰}$  (Table 3).

Miliacin  $\delta\text{D}$  values are, for HS  $\delta\text{D}$  value of  $-50\text{‰}$  V-SMOW nearby  $-111$  and  $-122\text{‰}$  V-SMOW. This last value is consistent with that found for miliacin  $\delta\text{D}$  values in seeds of millet grown in the field (Bossard et al., 2011) with a meteoric source water of  $-50\text{‰}$  (Milot et al., 2010). Miliacin  $\delta\text{D}$  values of plants growing with HS  $\delta\text{D}$  values of  $-50\text{‰}$  V-SMOW are in the same range as the few  $\delta\text{D}$  values measured for triterpenoids (Sessions et al., 1999; Chikaraishi et al., 2004). The  $\epsilon_{\text{app}}$  of miliacin is about  $-119$  in average whereas triterpenoids  $\epsilon_{\text{app}}$  range from  $-191$  to  $-122$  for *Spartina alterniflora* (Sessions, 2006) and  $-150$  (Sauer et al., 2001).

The  $\epsilon_{\text{net}}$  of miliacin ( $-114$ ) cannot be compared to other  $\epsilon_{\text{net}}$  measured for pentacyclic triterpenoids. The only  $\epsilon_{\text{net}}$  for triterpenoids in C4 plants reported up to now concerns sterols from *Zea mays* were  $-202$  and  $-211$ , depending of the growth temperature (Zhou et al., 2010).

## (3) Relationship between compound-specific, leaf water, and HS $\delta\text{D}$ values

As illustrated earlier, the  $\delta D$  values of miliacin and *n*-alkanes correlate with leaf water  $\delta D$  values and not HS  $\delta D$  values (Figure 56). The slopes of the *n*-alkanes and miliacin  $\delta D$  values vs. HS  $\delta D$  values are closer to that of leaf water  $\delta D$  values vs. HS  $\delta D$  slope than to that of the 1:1 linear regression (Figure 56). It is also illustrated by larger standard deviation for  $\epsilon_{app}$  than for  $\epsilon_{net}$  for all compounds (Table 17).

Several studies showed that  $\delta D$  values of biochemicals are driven by  $\delta D$  values of leaf water, which integrates the  $\delta D$  values of meteoric water and evapotranspiration processes (Sessions et al., 1999; Chikaraishi and Narakoa, 2003; Hou et al., 2007b; McInerney et al., 2011). Our results clearly suggest that the  $\delta D$  values of *n*-alkanes and miliacin are more closely related to leaf water  $\delta D$  values than to HS  $\delta D$  values (Table 18 and Figure 56). This suggests that evapotranspiration processes that affect  $\delta D$  values of leaf waters will have a strong impact on the  $\delta D$  values of biological compounds synthesized in leaves, i.e. the factors controlling the transpiration of the plants will strongly influence the  $\delta D$  values of biochemicals (Gleixner et Mugler, 2007; Sessions et al., 1999; Hou et al., 2007a,b).

#### (4) Differences in $\epsilon_{net}$ between miliacin and *n*-alkanes

$\epsilon_{net}$  was  $-114 \pm 10$  for miliacin whereas it reached  $-147 \pm 6$ ,  $-154 \pm 17$ ,  $-141 \pm 17$  and  $-140 \pm 20$  for *n*-C<sub>25</sub>, *n*-C<sub>27</sub>, *n*-C<sub>31</sub> and *n*-C<sub>33</sub> (Table 17). This depletion of ca. 40‰ for *n*-alkanes compared to a pentacyclic triterpene can be attributed to the distinct metabolic pathways leading to these compounds (Chikaraishi et al., 2009; Sessions et al., 1999; Sessions, 2006; Zhou et al., 2011). These distinct pathways not only involve distinct enzymatic processes but also different pools of hydrogen (within the cytosol and the plastid), for example during the steps of hydrogenation and deshydrogenation, via NADPH (Chikaraishi et al., 2009). Those different hydrogen pools could reflect differential conditions that prevail in the cell compartments (Shen et al., 2013).

### c) Impact of relative humidity

#### (1) Impact of relative humidity on leaf water $\delta D$ values

Leaf waters (panicle waters displayed in Table 3) display different  $\delta D$  values for the same HS  $\delta D$  values at two humidity conditions (61 % and 74 %). For example, HS  $\delta D$  values of -15 and -10‰,  $\delta D$  values of water in panicles is 26‰ at 61 % humidity and 9‰ at 74 % humidity. This indicates that leaf water  $\delta D$  values are not only impacted by the  $\delta D$  values of HS, but also that leaf transpiration is dependent on relative humidity. This illustrates the impact of relative humidity on

water fluxes controls in stomata (Manzoni et al., 2013) attested by increasing fractionation of leaf water with increasing humidity.

## (2) Impact of relative humidity on compound-specific $\delta D$ values

At first order, and as described above, miliacin and *n*-alkanes  $\delta D$  values are strongly correlated to leaf water  $\delta D$  values. For a given relative humidity,  $\epsilon_{\text{net}}$  is rather constant with increasing HS  $\delta D$  values. This is consistent with previous studies (i.e. Hou et al., 2007b; Chikaraishi et al., 2009; Kahmen et al., 2013a). As written by Sachse et al. (2010), lipids  $\delta D$  values are mainly controlled by HS water  $\delta D$ , *via* leaf water  $\delta D$ . However, the leaf water enrichment compared to the hydroponic solution is mainly due to the humidity that partly controls transpiration (Kahmen et al., 2013a,b).

At second order, tiny but significant differences in the response of *n*-alkanes and of miliacin could provide clue information on the respective impacts of source water  $\delta D$  values and relative humidity on  $\delta D$  values of biochemicals.  $\epsilon_{\text{net}}$  for the *n*-C<sub>25</sub> alkane is similar (-146 and -147‰) for both relative humidity (respectively 61 and 74%; Table 18). This is consistent with the constant  $\epsilon_{\text{net}}$  reported for this compound in other studies (Hou et al., 2007b; Kahmen et al., 2013b; Zhou et al., 2010). For longer chain *n*-alkanes (*n*-C<sub>27</sub>, *n*-C<sub>31</sub> and *n*-C<sub>33</sub>), the difference of  $\epsilon_{\text{net}}$  for to relative humidity levels increases with increasing chain length: -146/-160‰ for *n*-C<sub>27</sub>, -127/-155‰ for *n*-C<sub>31</sub>, and -124/-155‰ for *n*-C<sub>33</sub>, i.e. 14, 28 and 31‰ additional fractionation of hydrogen isotopes for 13% more humid conditions. The same feature is observed, to a lesser extent, for miliacin. Miliacin  $\epsilon_{\text{net}}$  is about 106‰ for a relative humidity of 61% and 122‰ for a relative humidity of 74%, i.e. a difference of 16‰ imputable to a 13% difference in relative humidity.

The distinct behaviour of these compounds towards humidity could be related to the location of their synthesis within the cell. *n*-Alkanes are first biosynthesised in the chloroplast up to 16 to 18 carbon atoms. Then, elongation processes are realized in the cytosol (Zhou et al., 2010; Grice et al., 2008). Thus, the contribution of hydrogen originating from the chloroplast decreases with increasing chain length. As other pentacyclic triterpenes, miliacin can be produced through two distinct biosynthetic pathways. The mevalonate pathway (MVA, realized in the chloroplast) and the non-mevalonate pathway (MEP/DOXP, realized in the cytosol) can both be used to synthesize these compounds, depending of environmental factors. The distinction between these two pathways cannot be readily achieved due to interferences and exchanges of common precursors between both pathways, i.e. between the cytosol and the chloroplast (Bartram et al., 2006; Hemmerlin et al., 2012).



The heterogeneity of the water  $\delta D$  values in cells has been demonstrated in previous studies (Bariac et al., 1994a, Hou et al., 2008; Santrucek et al., 2007; Zhou et al., 2010). It results in a high variability of  $\delta D$  values of hydrogen/deuterium pools available for biosynthesis (Chikaraishi et al., 2003; Sessions et al., 1999). As a matter of fact, several authors have demonstrated that NADPH  $\delta D$  values are dependent from the compartment from which they are produced (Schmidt et al., 2003; Sessions, 2006; Zhang et al., 2008).

Our working hypothesis, which must be confirmed by additional cultivation of plants in climatic chambers, under varying levels of relative humidity, is that differences in  $\delta D$  values of compounds produced via distinct biosynthetic pathways (thus with distinct sources of hydrogen within cells) in a single plant could help discriminating the impacts of relative humidity and of source water  $\delta D$  values in order to refine the palaeoclimatic interpretation of  $\delta D$  values of sedimentary compounds.

## 7. Conclusion

The quality of interpretation of  $\delta D$  values of single molecules retrieved from sedimentary archives in paleoclimatic studies, and the potential to obtain quantitative estimates of variables that define the hydrological, are contingent upon our understanding of the main parameters that affect these  $\delta D$  values. Our contribution was conducted on *Panicum miliaceum* plants that were cultivated in controlled conditions over hydroponic solutions of varying  $\delta D$  values, and under two relative humidity levels.

$\delta D$  values of *n*-alkanes and miliacin show a strong correlation with leaf water  $\delta D$  values as attested by relatively constant net biosynthetic fractionation of -147‰ for *n*-C<sub>25</sub>, -154‰ for *n*-C<sub>27</sub>, -141‰ for *n*-C<sub>31</sub>, -140‰ for *n*-C<sub>33</sub> and -114 for miliacin whereas apparent biosynthetic fractionation are highly variable. Our results thus confirm that leaf water  $\delta D$  values (which integrate source water  $\delta D$  values and transpiration) are the main control on  $\delta D$  values of biochemicals.

Considering that the difference of net biosynthetic fractionations between two humidity levels increase for *n*-alkanes of increasing chain length (and distinctively for miliacin), we suspect that the respective impacts of humidity and source water  $\delta D$  values could be discriminated by comparing  $\delta D$  values of compounds produced through distinct biosynthetic pathways with hydrogen atoms originating from distinct compartments with photosynthetic cells. This hypothesis must be confirmed with additional experiments involving a larger number of relative humidity levels.

## 8. Acknowledgments

This work is part of the PalHydroMil Project, supported by Agence Nationale de la Recherche grant (ANR JCJC, 2011-2013). N. Bossard receives a PhD grant provided by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (Action Thématique Prioritaire, 2009-

2012). V.J. Terwilliger was hosted at ISTO under the auspices of Le Studium® (Loire Institute for Advanced Studies).

#### **D. Effet d'un gradient de PolyEthylèneGlycol (PEG) sur le fractionnement des isotopes de l'hydrogène pendant la synthèse de lipides par *Panicum miliaceum*. Expériences en chambre climatique.**

*Cette partie n'a pu être intégrée dans l'article du fait d'une mauvaise croissance des plants de millet. Dès après l'ensemencement, ils avaient déjà eu tendance à fleurir en à peine 15 jours alors qu'ils ne mesuraient que quelques cm et qu'ils n'avaient toujours pas été mis dans les chambres climatiques. On suppose que ces plants ont détecté la saison hivernale et ont donc précipité leur cycle. Je vais cependant traiter de ce sujet dans cette partie, car les résultats sont prometteurs et que les plantes traitées peuvent être comparées aux plantes témoins.*

Nous avons dans la partie précédente testé différents facteurs afin d'évaluer leurs impacts sur le  $\delta D$  miliacine : variété de *P. miliaceum*,  $\delta D$  de la solution hydroponique, humidité relative. Le dernier facteur pouvant avoir un impact sur les valeurs de  $\delta D$  de la miliacine est un stress hydrique, c'est-à-dire un manque d'eau à la racine. Nos cultures se font en milieu hydroponique, c'est-à-dire que la plante a les racines dans l'eau. Afin de simuler un manque d'eau à la racine, nous avons ajouté du Polyéthylène Glycol (PEG) dans les bacs d'eau. Les racines ressentent cet ajout comme un manque d'eau puisqu'elles auront plus de mal à pomper cette eau. Le gradient que nous avons utilisé va de 0 à -7,5bars. L'effet du PEG peut aussi être comparé à celui de textures différentes du sol (sableuse vs argileuse) (Imhoff et al., 2010).

Le PEG est couramment utilisé pour appliquer ou simuler des stress hydriques mais l'expression de son unité varie selon les auteurs, ainsi certains l'exprimeront en concentration de PEG (mM ou %) (Bajji et al., 2000 ; Linossier et al., 1999 ; O'Donnel et al., 2013), d'autres en Pascal (MPa) (Kawasaki et al., 1983 ; Morgan et al., 1990 ; Huang et Song, 2013 ; O'Donnel et al., 2013) et d'autres encore en atmosphère (atm) (Macklon et Weatherley, 1965). La fiche technique du produit et l'habitude du laboratoire BIOEMCO est d'exprimer ses valeurs en bar, c'est pourquoi nous avons choisi cette unité. Mais toutes les expressions sont liées :  $10^5 \text{Pa} = 1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm}$ . De plus, un lien est établi entre quantité en PEG et pression osmotique, c'est-à-dire la force de rétention en eau (Figure 57).

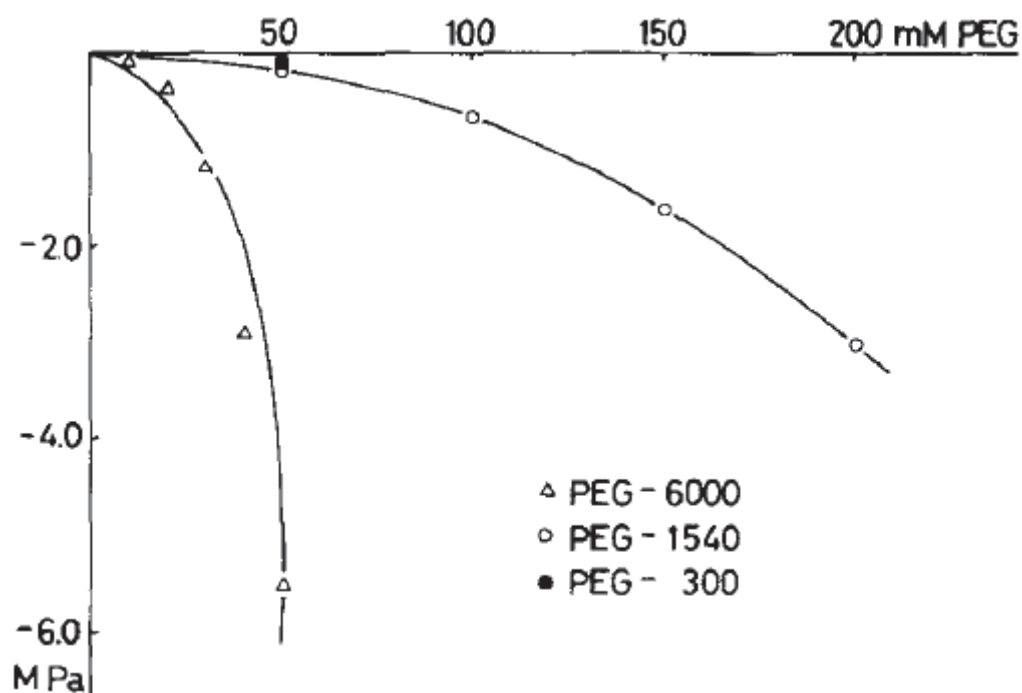
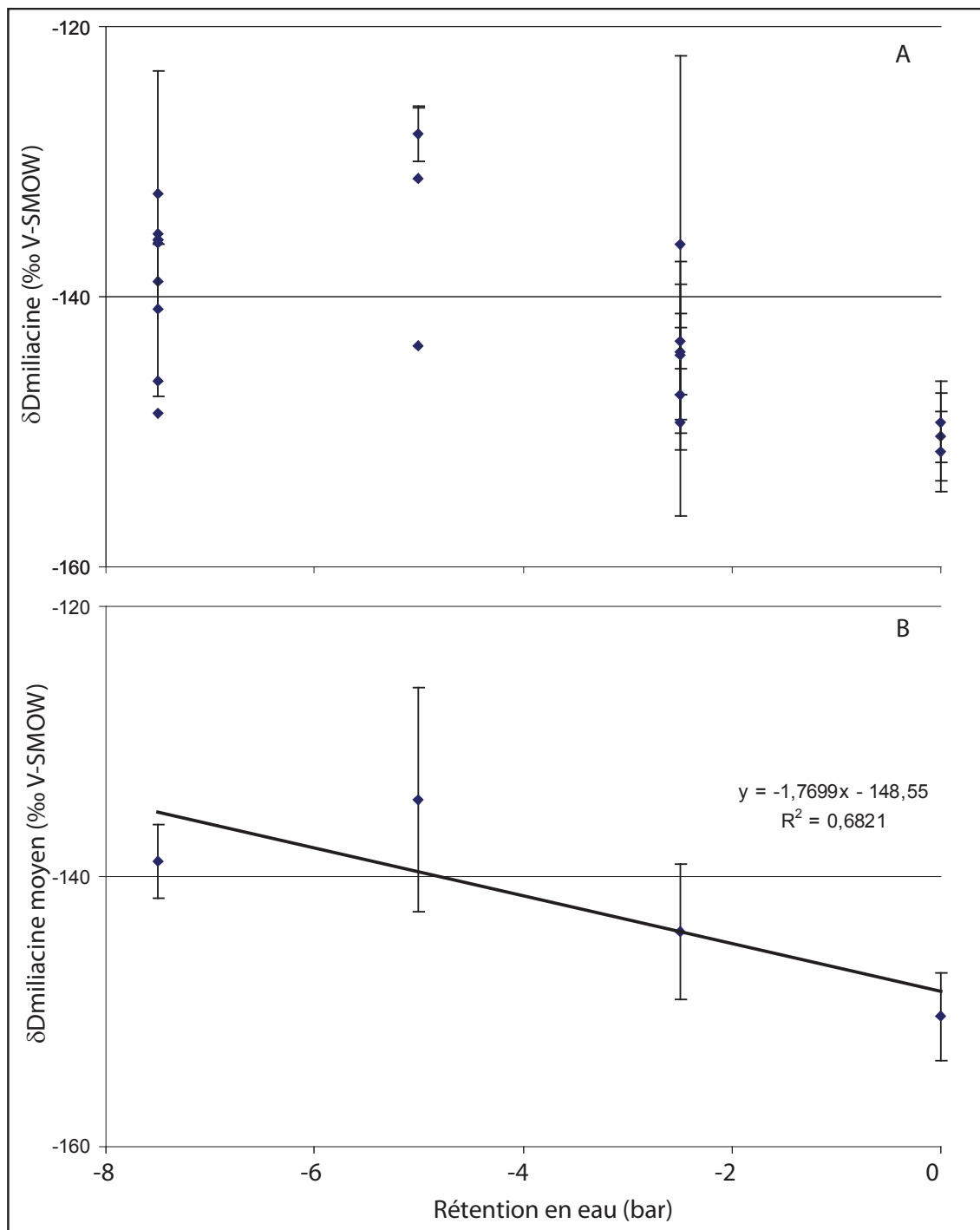


Figure 57 : Relations entre concentration en PEG et pression osmotique.

Dans notre expérience, nous avons fait germer les graines sur vermiculite, puis adapté à la culture en solution hydroponique dans les chambres climatiques. Les plantes sont au nombre de 5 dans les bacs pour chacun des traitements, et le PEG est ajouté progressivement pour chaque traitement. Pour le témoin, aucun PEG n'est ajouté. Pour le bac à -2.5 bars, nous avons ajouté le PEG aussitôt après acclimatation (1 semaine). Les bacs à -5, -7.5 et -10 bars sont également passés à -2.5 bars au bout d'une semaine. Une semaine après, on ajoute une quantité donnée de PEG pour atteindre une pression osmotique de -5 bars dans les bacs à -5, -7.5 et -10 bars. La semaine suivante, les bacs -7.5 et -10 bars sont passés à une pression osmotique de -7.5 bars. Au bout d'une semaine, les plantes furent trop desséchées pour augmenter la pression osmotique du dernier bac à -10 bars. Par conséquent, le gradient ne sera que de 0 à -7.5 bars.

Les plantes ne se sont pas autant développées dans cette expérience que dans celle durant laquelle nous avons fait varier le  $\delta D$  de la solution hydroponique. La conséquence a été un manque de matériel pour analyser les valeurs isotopiques de l'eau des plantes. Il en a été de même pour la quantité de miliacine dans les graines. Les épis étaient formés de très peu de graines et, par conséquent, très peu de miliacine a pu être extraite afin de réaliser les mesures isotopiques. C'est ce qui explique les incertitudes importantes de nos mesures de  $\delta D$  miliacine. Le  $\delta D$  miliacine des plants (Figure 58-A) et le  $\delta D$  miliacine moyen par traitement (Figure 58-B).



**Figure 58 : Evolution du  $\delta D$  miliacine (en‰ V-SMOW) en fonction de la pression osmotique exprimée en bar. A :  $\delta D$  miliacine des plantes avec l'écart-type analytique. B :  $\delta D$  miliacine moyen en fonction de la rétention en eau avec l'écart-type entre les différentes plantes.**

Malgré la forte variabilité analytique des valeurs  $\delta D$  miliacine, on peut observer un enrichissement en D en fonction de l'augmentation de la concentration en PEG (ou augmentation en rétention en eau ou encore augmentation de la pression osmotique). On remarquera que la valeur du  $\delta D$  miliacine pour une rétention en eau de -7.5 bars semble être au même niveau que les valeurs  $\delta D$  miliacine des graines des plantes à -5 bar. Le  $\delta D$  miliacine varie ainsi de -148‰ V-SMOW pour la miliacine des graines des plants dans la solution hydroponique sans stress

particulier une valeur de  $\delta D$  miliacine de près de -130‰ pour une pression osmotique de -5 bars, ce qui veut dire un shift du  $\delta D$  miliacine de 20‰ pour un changement de -5 bars en pression osmotique. Il semblerait qu'aucun shift supérieur ne puisse être observé puisque la plante ne pourra se développer pour des pressions osmotiques au-delà de -7.5 bars et que le seuil de tolérance est à -5 bars.

Dans des études antérieures, -7.5 bars est la valeur maximale utilisée par Kawasaki et al. (1983). Les plantes étudiées (haricot et maïs) présentaient déjà une biomasse divisée par 3 (que ce soit pour la taille du plant ou pour la longueur des racines) comparée aux conditions normales. O'Donnel et al. (2013) ont aussi utilisé du PEG sur du Sorgho. Ils ont atteint un maximum de -5 bars. Pour cette valeur de -5 bars, ces auteurs observaient déjà une biomasse totale de la plante divisée par 2. Ces auteurs ont également abordé le problème de la récupération de la plante après un traitement au PEG. Une fois le traitement au PEG arrêté, la plante ne présente pas d'améliorations, en termes de croissance, comparée aux plantes pour lesquelles une pression osmotique à -5 bars est conservée. En revanche, les photosystèmes des plantes remises dans des conditions normales retrouvaient une activité sensiblement identique à celle du témoin. Cette observation vient donc renforcer ce que l'on avait observé pour les valeurs  $\delta D$  miliacine du champ de Mézières-lez-Cléry (Bossard et al., 2011). A savoir que les valeurs  $\delta D$  étaient indépendantes de la taille des plants.

On peut ainsi conclure que la miliacine retrouvée dans les graines n'est pas marqueur des stress passés qu'a subi la plante, ou alors que ce signal a été dilué, mais que le  $\delta D$  miliacine des graines est marqueurs des conditions hydrologiques contemporaines à la synthèse de la miliacine.

### **Synthèse de la partie sur le stress hydrique aux racines**

Pour conclure et en comparaison de l'article, on peut dire que pour un shift en  $\delta D$  miliacine de +10‰ V-SMOW, il faut une pression de rétention en eau due au PEG de plus de 5 bars (5.65) ce qui est très difficilement supportable pour la plante et a priori peu réaliste en milieu naturel.

### **Synthèse de la partie Calibration**

Le fractionnement biosynthétique apparent pour la miliacine est identique pour des variétés rudérales et pour la variété cultivée (*Sunrise*) de *P. miliaceum*, que ce soit en conditions naturelles ou en conditions contrôlées.

Pour une augmentation du  $\delta D$  miliacine de 10‰ V-SMOW, il faut, selon les conditions testées :

+50‰ V-SMOW du  $\delta D$  de la SH à une humidité relative de 61%  
+21‰ V-SMOW du  $\delta D$  de la SH à une humidité relative de 74%  
+15‰ V-SMOW du  $\delta D$  météorique de Mézières (sauf si effet humidité ?)  
-2% en humidité relative pour un  $\delta D$  de SH de -20‰ V-SMOW.





# CONCLUSIONS

## A. Pertinence du proxy $\delta D$ miliacine

### 1. Spécificité de la miliacine

La miliacine est synthétisée en quantité importante dans le millet commun *Panicum miliaceum*. Nous n'avons pas réussi à détecter de miliacine dans les graines d'une des trois variétés de *Setaria italica*. Nous n'avons pas non plus réussi à détecter la miliacine dans *Chaetomium olivaceum*, que ce soit dans le milieu de culture ou dans l'organisme. La miliacine a été détectée dans toutes les graines des espèces de *Panicum* analysées ainsi que dans quelques espèces de *Pennisetum*, un genre phylogénétiquement intermédiaire entre *Panicum* et *Setaria*. Dans le contexte du Lac du Bourget, aucune de ces autres plantes n'avait été inventoriée. On peut donc certifier que la miliacine présente dans les sédiments du lac du Bourget datés de l'âge du Bronze provient essentiellement de *Panicum miliaceum*.

### 2. Variabilité temporelle

Le  $\delta D$  de la miliacine extraite des graines de millet présente une variabilité interannuelle. Cette variabilité est certainement due aux conditions hydrologiques qui changent d'une année sur l'autre, qu'il s'agisse du  $\delta D$  des eaux météoriques ou de l'humidité relative. Un appauvrissement en deutérium de l'eau météorique conduit à un appauvrissement en deutérium de la miliacine des graines du champ de Mézières. Pourtant, une diminution de 15‰ du  $\delta D$  des eaux météoriques ne provoque qu'une diminution de 10‰ du  $\delta D$  de la miliacine. Cependant, il n'est pas certain que seul le  $\delta D$  de l'eau météorique ait conduit à ce changement, l'humidité relative pouvant également avoir joué un rôle en contrôlant le taux de transpiration.

### 3. Variabilité spatiale

Le  $\delta D$  miliacine des graines des plantes cultivée dans le champ de Mézières-lez-Cléry présente une forte variabilité (plus de 50‰ V-SMOW). L'écart-type entre les plants est de 9‰ et se réduit à 6‰ lorsque l'on moyenne les plants par site, avec une variabilité de 30‰ V-SMOW. Cette variabilité n'est pas dépendante de la taille du plant ou de la position du plant dans le champ. Cependant, malgré cette large gamme de  $\delta D$  miliacine mesuré à l'échelle d'un champ, sa distribution normale implique que le  $\delta D$  miliacine moyen, ici de -121‰ V-SMOW, est caractéristique des conditions environnementales locales au temps de formation de la miliacine. On suppose que c'est cette moyenne qui sera ensuite archivée dans les sédiments et/ou sol.

### 4. Transfert du signal

#### a) Transfert plante-sol

Le  $\delta D$  miliacine du sol présente la même variabilité que le  $\delta D$  miliacine des plantes moyenné par site, soit 6‰ V-SMOW. La moyenne des valeurs  $\delta D$  miliacine des sols prélevés en avril 2011 est de -136‰ V-SMOW et diffère de la moyenne du  $\delta D$  miliacine des plantes prélevées

en septembre 2009. Par contre, la moyenne du  $\delta D$  miliacine des sols est proche du  $\delta D$  miliacine des graines des plantes prélevées en septembre 2010 qui est de  $-132\text{‰}$  V-SMOW. On en conclut que le  $\delta D$  miliacine des graines des plantes est bien transféré au sol, mais qu'en plus, seule la dernière culture laisse son empreinte dans le sol. Ceci peut être dû à une dégradation de la miliacine des cultures antérieures et/ou à un transfert de la miliacine des cultures précédentes dans une autre archive, le sol jouant le rôle d'archive transitoire.

### **b) Homogénéité de l'archivage du $\delta D$ miliacine dans les sédiments**

Peu de valeurs  $\delta D$  miliacine ont pu être mesurées pour les sédiments du Lac du Bourget du fait de trop faibles concentrations en miliacine dans ces sédiments. Cependant, les deux seules valeurs de  $\delta D$  miliacine obtenues dans les sédiments profonds du Lac du Bourget sont en accord avec les valeurs de  $\delta D$  miliacine obtenues sur une carotte de paléofumier prélevée sur un site archéologique littoral du même âge que les sédiments étudiés. Par conséquent, le même transfert avec la même chronologie existe pour le transfert de la miliacine depuis la plante jusqu'au sol/paléofumier et jusqu'au sédiment.

## **B. Facteurs impactant le $\delta D$ moléculaire et quantification**

### **1. Fractionnement biosynthétique de diverses variétés de millet**

Deux variétés de millet ont été cultivées dans les mêmes conditions environnementales dans une chambre climatique. L'une étant la variété « sunrise » actuellement cultivée dans le champ de Mézières-lez-Cléry et l'autre étant la variété « black seeds », une variété adventice, c'est-à-dire qui pousse à l'état sauvage dans les champs et qui est supposée correspondre un peu plus aux variétés plus anciennes ayant subi une pression sélective moindre. Il apparaît que ces deux variétés ont le même fractionnement biosynthétique apparent. Cette observation est confirmée par l'étude d'une variété rudérale et d'une variété cultivée de millet prélevées sur 3 sites chinois. Si l'on suppose que ces plantes, prélevées au même endroit, ont eu la même eau source et les mêmes conditions hydrologiques, puisqu'elles présentent le même  $\delta D$  miliacine, alors elles ont effectivement le même fractionnement biosynthétique apparent.

### **2. $\delta D$ de l'eau source**

Le premier facteur qui contrôle le  $\delta D$  moléculaire est le  $\delta D$  de l'eau source. Dans notre cas, puisque les plantes ont été cultivées sur solution hydroponique, c'est le  $\delta D$  de la solution hydroponique qui contrôle le  $\delta D$  moléculaire. Si cette proposition est valide au premier ordre, notons que le  $\delta D$  moléculaire est davantage corrélé au  $\delta D$  de l'eau de la feuille qu'au  $\delta D$  de la solution hydroponique. C'est-à-dire que les facteurs qui impacteront le  $\delta D$  de l'eau foliaire (humidité relative, température...) sont susceptibles d'avoir un fort impact sur le  $\delta D$  moléculaire.

Pour les deux cultures, dans deux conditions d'humidité différentes, un enrichissement en D de la miliacine de  $10\text{‰}$  est dû à un enrichissement en D de la solution hydroponique de  $50\text{‰}$  V-SMOW à  $61\text{‰}$  d'humidité relative et de  $21\text{‰}$  à  $74\text{‰}$  d'humidité relative pour des gammes de  $\delta D$  solution hydroponique correspondant au milieu naturel. Il sera respectivement de  $30\text{‰}$  et  $25\text{‰}$

pour la gamme entière de variations du  $\delta D_{SH}$  (depuis -50 jusqu'au +200‰ V-SMOW, valeur espérée de la SH).

### **3. Stress hydrique à la racine (PEG)**

L'eau du sol peut être plus ou moins retenue dans le sol en fonction de sa texture. L'ajout de PEG à la solution hydroponique a permis de tester l'impact de ce facteur. Une augmentation de +20‰ des valeurs  $\delta D$  de la miliacine des graines est observée pour une augmentation de la rétention en eau de 5 bars, ce qui est la valeur maximale à laquelle le millet semble pouvoir croître.

### **4. Stress hydrique à la feuille (Humidité relative / température)**

L'humidité relative contrôle le  $\delta D$  de l'eau foliaire qui est utilisée pour la biosynthèse des composés organiques des végétaux. Un enrichissement en D de la miliacine est observé lorsque l'humidité relative diminue. Cet enrichissement est de +10‰ pour une diminution de l'humidité relative de 2 % et pour une solution hydroponique à -20‰.

## **C. Avantages et inconvénients du $\delta D$ moléculaire sur composés spécifiques pour reconstituer les variations du cycle hydrologique**

Les isotopes de l'hydrogène sont très sensibles aux conditions environnementales, et sont directement reliés au cycle hydrologique. Les composés lipidiques, qui ont l'avantage d'être relativement résistants à la diagenèse, sont constitués d'une part importante d'hydrogène lié de manière covalente aux atomes de carbone, ce qui doit permettre des mesures de  $\delta D$  fiables à condition que ces composés soient suffisamment abondants dans les échantillons.

Nous avons démontré l'intérêt de réaliser des mesures sur des composés spécifiques de leurs organismes source. L'inconvénient de cet avantage est que ces composés sont relativement rares dans les archives sédimentaires et que leur faible abondance ne garantit pas des mesures  $\delta D$  de bonne qualité. Cet inconvénient est renforcé dans le cadre d'études à haute résolution temporelle comme celle réalisée sur les carottes du Bourget puisque l'ambition de résolution temporelle très fine implique de faibles quantités de matériel disponible pour les mesures  $\delta D$ . Les résultats probants récents sur de nouveaux biomarqueurs moléculaires spécifiques des organismes source laissent toutefois entrevoir la possibilité d'étendre le panel de composés sur lesquels réaliser les mesures de  $\delta D$ . Une amélioration de la sensibilité des appareils de mesure devrait également permettre d'élargir le spectre de biomarqueurs moléculaires pour lesquels le  $\delta D$  peut être déterminé.



# PERSPECTIVES

## A. Hypothèses à confirmer ou à infirmer

1 : Le  $\delta D$  d'un composé ubiquiste, c'est-à-dire synthétisé par une multitude de producteurs primaires (cas des *n*-alcanes), semble refléter le  $\delta D$  de l'eau météorique. Le  $\delta D$  d'un composé plus spécifique, i.e. synthétisé par une seule espèce comme la miliacine et *Panicum miliaceum*, pourrait plutôt refléter les conditions aériennes, telle que l'humidité relative.

2 : Les changements écosystémiques induisent des changements de végétation qui conduisent à des fractionnements biosynthétiques apparents différents. Il faut donc veiller à prendre en considération ces changements de végétation lors de tentatives de quantification des changements hydrologiques à partir du  $\delta D$  moléculaire. Cela veut dire qu'un changement de végétation peut amener une variation du  $\delta D$  moléculaire supérieure à celle induite par un changement d'humidité relative, elle-même supérieure à celle induite par un changement de  $\delta D$  de l'eau météorique. L'approche multi-moléculaire proposée dans ce manuscrit (composés issus de voies biosynthétiques distinctes) devrait permettre de déconvoluer les effets réciproques de ces facteurs.

3 : Un changement climatique peut induire un décalage des récoltes dans le temps. Le  $\delta D$  des eaux météoriques est variable au cours de l'année. Il serait donc important de vérifier si les variations de  $\delta D$  moléculaire peuvent être attribuées aux variations de composition de l'eau de source liées à des décalages de période de croissance des plantes. Dans ce cas, un biomarqueur ubiquiste synthétisé toute l'année sera sans doute plus pertinent qu'un biomarqueur spécifique dont la production est plus contrainte dans le temps (cas de la miliacine), et pourrait être décalé. Des pistes pour répondre à ces questions sont proposées dans la partie suivante qui traite de la déconvolution des différentes variables climatiques à partir d'une approche multi-moléculaire.

## B. Pistes de recherche au-delà des études "paléo"

### a) Efficience d'irrigation – Outil potentiel de diagnostic

Le  $\delta D$  est utilisé pour reconstituer les variations hydrologiques dans le passé mais il est cependant calibré sur des conditions actuelles. Tout comme la variabilité de la quantité d'amidon est étudiée dans les graines afin de diagnostiquer l'état d'un champ, la variabilité du  $\delta D$  moléculaire observée à l'échelle d'un champ serait susceptible de rendre compte des conditions hydrologiques contraignantes que ressent la plante. En réalisant les mesures sur différents types de composés, il serait par ailleurs possible de déterminer à quel moment la plante a subi tel ou tel stress hydrique (voir point "c").

### **b) L'osmose et l'hydrogène – Utilisation des isotopes de l'hydrogène comme indicateur de stress hydrique dans d'autres cas que les plantes**

De nombreuses pompes à proton sont présentes dans les membranes cellulaires. Il devrait donc être possible d'utiliser le  $\delta D$  moléculaire pour diagnostiquer le fonctionnement de ces pompes. Les seules études dont j'ai pu avoir connaissance dans cette thématique, sont des études qui relient des changements de  $\delta D$  aux variations de pH intracellulaire, contrôlé par des pompes à proton. L'inconvénient majeur sera de n'avoir que de faibles quantités des composés puisqu'on s'intéressera aux molécules d'une zone restreinte. Cet inconvénient pourrait être contourné en s'intéressant à certains types de protéines qui seront plus abondants que les lipides.

### **c) Déconvolution des différents signaux climatiques en utilisant une approche multi-moléculaire - Molécule stockée vs molécule en turn-over**

Toutes les voies métaboliques ne sont pas activées de manière synchrone au cours du cycle de vie d'une plante. Certains composés seront donc synthétisés pendant une phase de croissance, alors que d'autres seront synthétisés pendant une phase de maturation. Par exemple, les plantes vont privilégier leur cycle de croissance jusqu'à la période de reproduction, moment à partir duquel elles vont allouer l'énergie à cette fonction en mettant en pause les autres. En comparant par exemple le  $\delta D$  des différents signaux cellulaires utilisés lors de ces différentes phases, il devrait être possible de retranscrire les différentes conditions hydrologiques qu'a connues la plante au cours de son développement. Cela a déjà été plus ou moins vérifié en comparant le  $\delta D$  de l'amidon des graines, considéré comme stable puisque les enzymes de type hydrolases sont inactives, et le  $\delta D$  de lipides constitutifs des membranes cellulaires, qui sont censés refléter les conditions antérieures à la synthèse de l'amidon. De telles analyses pourraient ainsi permettre de savoir précisément à quel moment les conditions hydrologiques sont enregistrées. Par exemple en déterminant si un composé est synthétisé tout au long de la journée, préférentiellement la nuit, préférentiellement le jour. On le voit bien, le moment de la synthèse du composé aura d'importants impacts sur le  $\delta D$  de l'eau foliaire qui est le facteur premier de contrôle du  $\delta D$  moléculaire. A l'échelle de l'écosystème, cela pourrait être fait en comparant le  $\delta D$  de composés détectés dans les archives dont un serait synthétisé par une plante printannière par rapport à une plante d'automne, ou encore en comparant le  $\delta D$  de composés, qui sans être spécifiques, seront préférentiellement synthétisés à une période donnée.

## REFERENCES

- Abe, S. (1960). Chemical structure of miliacin. Bulletin of the Chemical Society of Japan 33, 271-272.
- Alley, R.B., Agustsdottir, A.M. (2005). The 8k event: cause and consequences of a major Holocene abrupt climate change. Quaternary Science Reviews 24, 1123–1149.
- Arnaud F. (2003). Signature climatique et anthropique dans les sédiments Holocène des lacs du Bourget et d'Anterne (nord-ouest des Alpes). Paléohydrologie et contamination au plomb. Thèse de doctorat, Université Lille I, 248 p.
- Arnaud, F., Revel, M., Chapron, E., Desmet, M., Tribovillard, N. (2005). 7200 years of Rhone river flooding activity in Lake Le Bourget, France: a high-resolution sediment record of NW Alps hydrology. The Holocene 15, 420-428.
- Bai, Y., Fang, X., Gleixner, G., Mugler, I. (2011). Effect of precipitation regime on  $\delta D$  values of soil n-alkanes from elevation gradients - Implications for the study of paleo-elevation, Organic Geochemistry 42, 838–845.
- Bajji, M., Lutos, S., Kinet, J.M. (2000). Physiological changes alter exposure and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus cultures issued from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. Journal of Plant Physiology 156, 75-83.
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R (2002). Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. Journal of Microbiological Methods 50, 227-236.
- Bariac, T., Gonzalez-Dunia, J., Katerji, N., Béthenod, O., Bertolini, J.M., Mariotti, A. (1994a). Spatial variation of the isotopic composition of water ( $^{18}O$ ,  $^2H$ ) in the soil-plant-atmosphere system, 2. Assesment under field conditions. Chemical Geology (Isotope Geoscience Section) 115, 317-333.
- Bariac, T., Gonzalez-Dunia, J., Tardieu, F., Tessier, D., Mariotti, A. (1994b). Spatial variation of the isotopic composition of water ( $^{18}O$ ,  $^2H$ ) in organs of aerophytic plants : 1. Assesment under laboratory conditions. Chemical Geology (Isotope Geoscience Section) 115, 307-315.
- Barnes, C.J., Turner, J.V. (1998). Isotopic exchange in soil water. In: Kendall, C., McDonnell, J.J. (Eds.), Isotope tracers in Catchment Hydrology. Elsevier, Amsterdam, pp. 137-163.

- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., Boland, W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry* 67, 1661–1672.
- Bassinot, F.C. (2007). Paleoceanography, physical and chemical proxies. *Oxygen Isotope Stratigraphy of the Oceans. Encyclopedia of Quaternary Science*, 1740-1748.
- Bastos, D.Z.L., Pimentel, I.C., de Jesus, D.A., de Oliveira, B.H. (2007). Biotransformation of betulinic acids by fungi. *Phytochemistry* 68, 834-839.
- Benetzen, J.L., Schmutz, J., Wang, H., Percifield, R., Hawkins, J., Pontaroli, A.C., Estep, M., Feng, L., Vaughn, J.N., Grimwood, J., Jenkins, J., Barry, K., Lindquist, E., Hellsten, U., Deshpande, S., Wang, X., Wu, X., Mitros, T., Triplett, J., Yang, X., Ye, C.-Y., Mauro-Herrera, M., Wang, L., Li, P., Sharma, M., Sharma, R., Ronald, P.C., Panaud, O., Kellogg, E.A., Brutnell, T.P., Doust, A.N., Tuskan, G.A., Rokhsar, D., Devos, K.M. (2012). Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnology* 1-10.
- Benito, G., Rico, M., Sánchez-Moya, Y., Sopeña, A., Thorndycraft, V.R., Barriendos, M. (2010). The impact of late Holocene climatic variability and land use change on the flood hydrology of the Guadalentín River, southeast Spain. *Global and Planetary Change* 70, 53–63.
- Benito, G., Thorndycraft, V.R. (2005). Palaeoflood hydrology and its role in applied hydrological sciences. *Journal of Hydrology* 313, 3-15.
- Berger, A. (1992). *Le climat de la Terre : un passé pour quel avenir ?* Ed : De Boeck Supérieur, p479.
- Bi, X., Sheng, G., Liu, X., Li, C., Fu, J., 2005. Molecular and carbon and hydrogen isotopic composition of n-alkanes in plant leaf waxes. *Organic Geochemistry* 36, 1405-1417.
- Binford, M.W., Kolata, A.L., Brenner, M., Janusek, J.W., Seddon, M.T., Abbot, M., Curtis, J.H. (1997). Climate Variation and the Rise and Fall of an Andean Civilization. *Quaternary Research* 47, 235–248.
- Bossard, N., Jacob, J., Le Milbeau, C., Lallier-Verges, E., Terwilliger, V.J., Boscardin, R. (2011). Variation in  $\delta D$  values of a single, species-specific molecular biomarker : a study of miliacin throughout a field of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25, 1-9.
- Bouby, L., Billaud, Y. (2001). Economie agraire à la fin de l'âge du Bronze sur les bords du lac du Bourget (Savoie, France), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 333, 749-756.
- Boujamlaoui, Z., Bariac, T., Biron, P., Canale, L., Richard, P. (2005). Profondeur d'extraction racinaire et signature isotopique de l'eau prélevée par les racines des couverts végétaux. *Comptes Rendus Géoscience* 337, 589-598.



- Boyer, C., Chaumont, D., Chartier, I., Roy, A.G. (2010). Impact of climate change on the hydrology of St. Lawrence tributaries. *Journal of Hydrology* 384, 65-83.
- Brenninkmeijer, C.A.M. (2003). Isotopes, stable. *Encyclopedia of Atmospheric Sciences*, 1033-1041.
- Broecker, 1997 Thermohaline Circulation, the Achilles Heel of Our Climate System: Will Man-Made CO<sub>2</sub> Upset the Current Balance? *Science* 278, 1582-1588.
- Burton, G. R., Rosman, K. J. R., Candelone, J.-P., Burn, L. J., Boutron, C. F., Hong, S. (2007). The impact of climatic conditions on Pb and Sr isotopic ratios found in Greenland ice, 7–150 ky BP. *Earth and Planetary Science Letters* 259, 557-566.
- Burton, I. (1997). Vulnerability and adaptive response in the context of climate and climate change. *Climatic Change* 36, 185-196.
- Cane, M.A. (2005). The evolution of El Nino, past and future. *Earth and Planetary Science Letters* 230, 227–240.
- Castaneda, I. S., Schouten, S. (2011). A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Science Review* 30, 2851-2891.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Poulson, S.R. (2004a). Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* 65, 1369-1381.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Poulson, S.R. (2004b). Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*). *Phytochemistry* 65, 323-330.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H. (2003). Compound-specific  $\delta\text{D}$ - $\delta^{13}\text{C}$  analyses of *n*-alkanes extracted from terrestrial and aquatic plants. *Phytochemistry* 63, 361-371.
- Chikaraishi, Y., Narakoa, H., (2005).  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta\text{D}$  identification of sources of lipid biomarkers in sediments of Lake Haruna (Japan). *Geochimica Cosmochimica Acta* 69, 3285-3297.
- Chikaraishi, Y., Narakoa, H. (2006). Carbon and hydrogen isotop variation of plant biomarkers in a plant soil-system. *Chem. Geology* 231, 190-202.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H. (2007).  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta\text{D}$  relationships among three *n*-alkyl compound classes (*n*-alkanoic acid, *n*-alkane and *n*-alkanol) of terrestrial higher plants. *Organic Geochemistry* 38, 198-215.
- Chikaraishi, Y., Tanaka, R., Tanaka, A., Ohkouchi, N. (2009). Fractionation of hydrogen isotopes during phytol biosynthesis. *Organic Geochemistry* 40, 5, 569-573.

- Connolly, J.D., Hill, R.A. (1989). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 6, 475-501.
- Connolly, J.D., Hill, R.A. (1996). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 13, 151-169.
- Connolly, J.D., Hill, R.A. (2001). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 18, 560-578.
- Connolly, J.D., Hill, R.A. (2007). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 24, 465-486.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., Ngadjui, B.T. (1994a). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 11, 91-117.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., Ngadjui, B.T. (1994b). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 11, 467-492.
- Connor, H., Purdie, A. (1976). Triterpene methyl ether differentiation in *Chionochloa* (Gramineae). *New Zealand Journal of Botany*, 14, 315-326.
- Connor, H., Purdie, A. (1981). Triterpene methyl ethers in *Chionochloa* (Gramineae): Distribution in western South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 19, 161-170.
- Conte, M.H., Eglinton, G., Madureira, L.A.S. (1992). Long-chain alkenones and alkyl alkenoates as palaeotemperature indicators: their production, flux and early sedimentary diagenesis in the Eastern North Atlantic. *Organic Geochemistry* 19, 287-298.
- Corsmeier, U., Behrendt, R., Drobinski, P., Kottmeier, C. (2005). The mistral and its effect on air pollution transport and vertical mixing. *Atmospheric Research* 74, 275–302.
- Couchoud, I. (2008). Les spéléothèmes, archives des variations paléoenvironnementales. *Quaternaire* 19, 255-274.
- Craig, H. (1953). The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 3, 53-92.
- Craig, H. (1961). Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133, 1702-1703.
- Craig, H., Gordon, L.I., Horibe, Y. (1963). Isotopic exchange effects in the evaporation of water. *Journal of Geophysical Research* 68, 5079-5087.
- Cuenca-Bescós, G, Melero-Rubio, M., Rofes, J., Martínez, I., Arsuaga, J.L., Blain, H.-A., López-García, J.M., Carbonell, E., Bermudez de Castro, J.M. (2011). The Early Middle Pleistocene environmental and climatic change and the human expansion in Western Europe: A case study with small vertebrates (Gran Dolina, Atapuerca, Spain). *Journal of Human Evolution* 60, 481-491.
- Czymzik, M., Brauer, A., Dulski, P., Plessen, B., Naumann, R., von Grafenstein, U., Scheffler, R. (2013). Orbital and solar forcing of shifts in Mid- to Late Holocene flood intensity from varved

- sediments of pre-alpine Lake Ammersee (southern Germany). *Quaternary Science Reviews* 61, 96-110.
- Dansgaard, W., Johnsen, S.J., Clausen, H.B., Dahl-Jensen, D., Gundestrup, N.S., Hammer, C.U., Hvidberg, C.S., Steffensen, J.P., Svienbjörnsdottir, A.E., Jouzel, J., Bond, G. (1993). Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Nature* 364, 218-220.
- Dansgaard, W. (1964). Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16, 436-468.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. Ed: London John Murray.
- Das, M., Mahato, S. (1983). Triterpenoids. *Phytochemistry* 22, 1071-1085.
- Dawson, E.D., Ehleringer, J.R. (1991). Streamside trees that do not use stream water. *Nature* 350, 335-337.
- Debret, M., Chapron, E., Desmet, M., Rolland-Revel, M., Magand, O., Trentesaux, A., Bout-Roumazielle, V., Nomade, J., Arnaud, F. (2010). North western Alps Holocene paleohydrology recorded by flooding activity in Lake Le Bourget, France. *Quaternary Science Reviews* 29, 2185-2200.
- Delcourt, P.A., Delcourt, H.R. (1996). Quaternary paleoecology of the Lower Mississippi Valley. *Engineering Geology* 45, 219-242.
- DeNiro, M. J., Epstein, S. (1981). Isotopic composition of cellulose from aquatic organisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 1885-1894.
- Douglas, P. M. J., Pagani, M., Brenner, M., Hodell, D. A., Curtis, J. H. (2012). Aridity and vegetation composition are important determinants of leaf-wax  $\delta D$  values in southeastern Mexico and Central America. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 97, 24-45.
- Duplessy, J.-C., Labeyrie, L., Waelbroeck, C. (2002). Constraints on the ocean oxygen isotopic enrichment between the Last Glacial Maximum and the Holocene: Paleooceanographic implications. *Quaternary Science reviews* 21, 315-330.
- Durand, J.L., Bariac, T., Ghesquière, M., Biron, P., Richard, P., Humphreys, M., Zwierzykowski, Z. (2007). Ranking of the depth of water extraction by individual grass plants, using natural  $^{18}O$  isotope abundance. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 137-144.
- Eglinton, G., Bradshaw, S., Resell, A., Sarnthein, M., Pflaumann, U., Tiedemann, R. (1992). Molecular record of secular sea surface temperature changes on 100-year timescales for glacial terminations I, II and IV. *Nature* 356, 423-426.

- Ellsworth, P.Z., Williams, D.G. (2007). Hydrogen isotope fractionation during water uptake by woody xerophytes. *Plant and Soil* 291, 93–107.
- Evenset, A., Christensen, G.N., Carroll, J., Zaborska, A., Berger, U., Herzke, D., Gregor, D. (2007). Historical trends in persistent organic pollutants and metals recorded in sediment from Lake Ellasjøen, Bjørnøya, Norwegian Arctic. *Environmental Pollution* 146, 196-205.
- Ewert, F., Rodriguez, D., Jamieson, P., Semenov, M.A., Mitchell, R.A.C., Goudriaan, J., Porter, J.R., Kimball, B.A., Pinter Jr., P.J., Manderscheid, R., Weigel, H.J., Fangmeier, A., Fereres, E., Villalobos, F. (2002). Effects of elevated CO<sub>2</sub> and drought on wheat: testing crop simulation models for different experimental and climatic conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93, 249–266.
- Feakins, S. J., Sessions, A. L. (2010). Controls on the D/H ratios of plant leaf waxes in an arid ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2128-2141.
- Finney, B.P., Gregory-Eaves, I., Douglas, M.S.V., Smol, J.P. (2002). Fisheries productivity in the northeastern Pacific Ocean over the past 2,200 years. *Nature* 416, 729-733.
- Gabrielli, P., Barbante, C., Boutron, C., Cozzi, G., Gaspari, V., Planchon, F., Ferrari, C., Turetta, C., Hong, S., Cescon, P. (2005). Variations in atmospheric trace elements in Dome C (East Antarctica) ice over the last two climatic cycles. *Atmospheric Environment* 39, 6420-6429.
- Garcin, Y., Schwab, V.F., Gleixner, G., Kahmen, A., Todou, G., Séné, O., Onana, J.M., Achoundong, G., Sachse, D. (2012). Hydrogen isotope ratios of lacustrine sedimentary n-alkanes as proxies of tropical African hydrology: Insights from a calibration transect across Cameroon. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 79, 106-126.
- Giauque, W.F., Johnston, H.L. (1929). An isotope of oxygen, mass 17, in the earth's atmosphere. *Journal of the American Chemical Society* 51, 3528-3534.
- Giussani, L.M., Costa-Sanchez, J.H., Zuloaga, F.O., Kellogg, E.A. (2001). A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (poaceae) shows multiple origins of C<sub>4</sub> photosynthesis. *American Journal of Botany* 88, 1993-2012.
- Gleixner, G., Mügler, I. (2007). Compound-specific hydrogen isotope ratios of biomarkers: tracing climatic changes in the past. In T. E. Dawson, & R. T. W. Siegwolf (Eds.), *Stable isotopes as indicators of ecological change* (pp. 249 -266). Oxford: Academic press.
- Grant, W.D., West, A.W. (1986). Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of soil microbial biomass. *Journal of Microbiological Methods* 6, 47-53.
- Gray, J.E. (2007). Plant Development: Three Steps for Stomata. *Current biology*, 17: 213-215.

- Grice, K., Yu, H., Zhou, Y.P., Stuart-Williams, H., Farquhar, G.D. (2008). Biosynthetic and environmental effects on the stable carbon isotopic compositions of anteiso-(3-methyl) and iso-(2-methyl) alkanes in tobacco leaves. *Phytochemistry* 69, 2807–2814.
- Grimalt J.O., Lopez, J.F. (2007). Alkenone paleothermometry from coccoliths. *Paleoceanography, Biological proxies*, 1610-1618.
- Handmer, J.W., Dovers, S., Downing, T.E. (1999). Societal vulnerability to climate change and variability. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 4, 267-281.
- Helfer, F., Lemckert, C., Zhang, H. (2012). Impacts of climate change on temperature and evaporation from a large reservoir in Australia. *Journal of Hydrology* 475, 365-378.
- Hemmerlin, A., Harwood, J.L., Bach, T.J. (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in lipid research* 51, 95-148.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424 : 901–908.
- Hoeller Obrigkeit, D., Oepen, T., Jugert, F.K., Merk, H.F., Kubicki, J. (2006). Xenobiotics in vitro: The influence of L-cystine, pantothenat, and miliacin on metabolic and proliferative capacity of keratinocytes. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 25/1, 13-22.
- Hoffman, P.F., Kaufman. A.J., Halverson, G.P., Schrag, D.P. (1998). A Neoproterozoic snowball earth. *Science* 281, 1342–1346.
- Hoffmann, B., Kahmen, A., Cernusak, L.A., Arndt, S.K., Sachse, D. (2013). Abundance and distribution of leaf wax n-alkanes in leaves of *Acacia* and *Eucalyptus* trees along a strong humidity gradient in northern Australia. *Organic Geochemistry* 62, 62-67.
- Holmgren, M., Scheffer, M., Ezcurra, E., Gutiérrez, J.R., Mohren, G.M.J. (2001). El Niño effects on the dynamics of terrestrial ecosystems. *Trends in Ecology and evolution* 16, 89-94.
- Hou, J., D'Andrea, W.J., Huang, Y. (2008). Can sedimentary leaf waxes record D/H ratios of continental precipitation? Field, model, and experimental assessments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 3503-3517.
- Hou, J., D'Andrea, W.J., McDonald, D., Huang, Y. (2007a). Hydrogen isotopic variability in leaf waxes among terrestrial and aquatic plants around Blood Pond, Massachusetts (USA). *Organic Geochemistry* 38, 977-984.
- Hou, J., D'Andrea, W.J., Mac Donald, D., Huang Y. (2007b). Evidence for water use efficiency as an important factor in determining the  $\delta D$  values of tree leaf waxes. *Organic Geochemistry* 38, 1251-1255.

- Huang, Y., Shuman, B., Wang, Y., Grimm, E.C., Boutton, T., Terwilliger, V., Jacobson Jr., G.L., Webb, T.III, (2004). A 62,000 year record of environmental and climatic change inferred from carbon and hydrogen isotope stratigraphy of higher plant biomarkers at Lake Tulane, Florida. *J. Paleolimnology* 31, 363-375.
- Huang, Y., Shuman, B., Wang, Y., Webb, T. (2002). Hydrogen isotope ratios of palmitic acid in lacustrine sediments record late Quaternary climate variations. *Geology* 30, 1103-1106.
- Huang, H., Song, S. (2013). Change in dessication tolerance of maize embryos during development and germination at different water potential PEG-6000 in relation to oxidative process. *Plant Physiology and Biochemistry* 68, 61-70.
- Hunt, H.V., Campana, M.C., Lawes, M.C., Park, Y.-J., Bower, M.A., Howe, C.J., Jones, M.K. (2011). Genetic diversity and phylogeography of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) across Eurasia. *Molecular Ecology* 20, 4756-4771.
- Hurrell, J.W. (1995). Decadal trends in the North Atlantic Oscillation: Regional temperatures and precipitations. *Science* 269, 676-679.
- Imhoff, S., Kay, B.D., da Silva, A.P., Hajabbasi, M.A. (2010). Evaluating responses of maize (*Zea mays* L.) to soil physical conditions using a boundary line approach. *Soil and Tillage Research* 106, 303-310.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007). Climate Change 2007: The Physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Edited by S. Solomon et al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K. <http://ipcc-wg1.ucar.edu/wg1/wg1-report.html>.
- Itô, H. (1934). The chemical investigation of some gramineae oils. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University* XXXVII, 1-40.
- Jacob, H., Sonntag, C. (1991). An 8-year record of the seasonal-variation of H-2 and O-18 in atmospheric water-vapor and precipitation at Heidelberg, Germany. *Tellus* 43, 291-300.
- Jacob, J., Disnar, J.R., Arnaud, F., Chapron, E., Debret, M., Lallier-Vergès, E., Desmet, M., Revel-Rolland, M. (2008a). Millet cultivation history in the French Alps as evidenced by a sedimentary molecule. *Journal of Archaeological Science* 35, 814-820.
- Jacob, J., Disnar, J.R., Arnaud, F., Gauthier, E., Billaud, Y., Chapron, E., Bardoux, G. (2009a). Impacts of new agricultural practices on soil erosion during the Bronze Age in French Prealps. *The Holocene* 19, 241-249.
- Jacob, J., Disnar, J.R., Arnaud, F. (2009b). A new molecular marker to reconstruct past agricultural activity from sedimentary archives. *Lettre PIGB-PRMC France* n° 21, "Changement Global", 53-57.



- Jacob, J., Disnar, J.R., Bardoux, G. (2008b). Carbon isotope evidence for sedimentary miliacin as a tracer of *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) in the sediments of Lake le Bourget (French Alps). *Organic Geochemistry* 39, 1077-1080.
- Jacob, J., Disnar, J.R., Boussafir, M., Sifeddine, A., Albuquerque, A.L.S., Turcq, B. (2005). Pentacyclic triterpene methyl ethers in recent lacustrine sediments (Lagoa do Caçó, Brazil). *Organic Geochemistry* 36, 449–461.
- Jacob, J., Huang, Y., Disnar, J.-R., Sifeddine, A., Boussafir, M., Albuquerque, A.L.S., Turcq, B. (2007). Paleohydrological changes during the last deglaciation in Northern Brazil. *Quaternary Science Review* 26, 1004-1015.
- Jeng, W.-L., Wang, J., Hanb, B.-C., 1996. Coprostanol distribution in marine sediments off southwestern Taiwan. *Environmental Pollution* 96, 47-52.
- Jia, G., Wei, K., Chen, F., Peng, P. (2008). Soil n-alkane  $\delta D$  vs. altitude gradients along Mount Gongga, China. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5165–5174.
- Jiang, Q., Smith, R.B., Doyle, J. (2003). The nature of the mistral: observations and modelling of two MAP events. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 129, 857–876.
- Jouzel, J., Stiévenard, M., Johnsen, S.J., Landais, A., Masson-Delmotte, V., Sveinbjornsdottir, A., Vimeux, F., von Grafenstein, U., White, J.W.C. (2007). The GRIP deuterium-excess record. *Quaternary Science Reviews* 26, 1-17.
- Jung, M., Reichstein, M., Ciais, P., Seneviratne, S.I., Sheffield, J., Goulden, M.L., Bonan, G., Cescatti, A., Chen, J., de Jeu, R., Dolman, A.J., Eugster, W., Gerten, D., Gianelle, D., Gobron, N., Heinke, J., Kimball, J., Law, B.E., Montagnani, L., Mu, Q., Mueller, B., Oleson, K., Papale, D., Richardson, A.D., Rouspard, O., Running, S., Tomelleri, E., Viovy, N., Weber, U., Williams, C., Wood, E., Zaehle, S., Zhang, K. (2010). Recent decline in the global land evapotranspiration trend due to limited moisture supply. *Nature* 461, 951-955.
- Kahmen, A., Dawson, T.E., Vieth, A., Sachse, D. (2011). Leaf wax n-alkane  $\delta D$  values are determined early in the ontogeny of *Populus trichocarpa* leaves when grown under controlled environmental conditions. *Plant, Cell and Environment* 34, 1639-1651.
- Kahmen, A., Hoffmann, B., Schefuss, E., Arndt, S.K., Cernusak, L.A., West, J.B., Sachse, D. (2013a). Leaf water deuterium enrichment shapes leaf wax n-alkane  $\delta D$  values of angiosperm plants II: Observational evidence and global implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 111, 50–63.
- Kahmen, A., Schefuss, E., Sachse, D. (2013b). Leaf water deuterium enrichment shapes leaf wax n-alkane  $\delta D$  values of angiosperm plants I: Experimental evidence and mechanistic insights. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 11, 39-49.

- Kato, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S. (2001). Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 64-70.
- Kawasaki, T., Akiba, T., Moritsugu, M. (1983). Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylen glycol on the growth and ion absorption in plants. *Plant and Soil* 75, 75-85.
- Krull, E., Sachse, D., Mügler, I., Thiele, A., Gleixner, G., 2006. Compound-specific □13C a  
analyses of plant and soil organic matter: A preliminary assessment of the effects of vegetation change on ecosystem hydrology. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3211.
- Landais, A., Yakir, D., Barkan, E., Luz, B. (2007). The triple isotopic composition of oxygen in leaf water and its implications for quantifying biosphere productivity. *Terrestrial Ecology* 1, 111-125.
- Landais, A., Jouzel, J., Masson-Delmotte, V., Caillon, N. (2005). Large temperature variations over rapid climatic events in Greenland: a method based on air isotopic measurements. *Comptes Rendus Geoscience* 337, 947-956.
- Lavrieux, M., Jacob, J., Disnar, J.R., Bréheret, J.G., LeMilbeau, C., Miras, Y., Andrieu-Ponel, V. (2013). Sedimentary cannabiniol tracks the history of hemp retting. *Geology* 41, 751-754.
- Lavrieux, M., Jacob, J., Le Milbeau, C., Zocatelli, R., Masuda, K., Bréheret, J.G., Disnar, J.R. (2011). Occurrence of triterpenyl acetates in soil and their potential as chemotaxonomical markers of Asteraceae. *Organic Geochemistry* 42, 1315-1323.
- Le Hir, G., Ramstein, G., Donnadieu, Y., Pierrehumbert, R.T. (2007). Investigating plausible mechanisms to trigger a deglaciation from a hard snowball earth. *C.R. Geosciences* 339, 274-287.
- Le Milbeau, C., Lavrieux, M., Jacob, J., Bréheret, J.-G., Zocatelli, R., Disnar, J.-R. (2013). Methoxy-serratenes in a soil under conifers and their potential use as biomarkers of Pinaceae. *Organic Geochemistry* 55, 45-54.
- Leaney, F. W., Osmond, C. B., Allison, G. B., Ziegler, H. (1985). Hydrogen-isotope composition of leaf water in C3 and C4 plants: its relationship to the hydrogen-isotope composition of dray matter. *Planta* 164, 215-220.
- Lebar, M.D., Heimbergner, J.L., Baker, B.J. (2007). Cold-water marine natural products. *Natural Products Reports* 24, 774-797.
- Levrault, F. (2010). Atouts et vulnérabilités des productions agricoles face au changement climatique. *Livre vert du projet Climator*. Chapitre C1 p141-154.



- Lewis, G.N. (1933). The biochemistry of water containing hydrogen isotope. *Journal of American Chemical Society* 55, 3503-3504.
- Li, C., Sessions, A.L., Valentine, D.L., Thiagarajan, N. (2011). D/H variation in terrestrial lipids from Santa Barbara Basin over the past 1400 years: A preliminary assessment of paleoclimatic relevance. *Organic Geochemistry* 42, 15-24.
- Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of plant Physiology and Plant molecular Biology* 50, 47-65.
- Lin, G., Sternberg, L. (1993). Hydrogen isotopic fractionation by plant roots during water uptake in coastal wetland plants. In: *Stable Isotopes and Plant Carbon–Water Relations*, J. Ehleringer, A. Hall, G. Farquhar (Eds.), Academic Press Inc., San Diego, pp. 497–510.
- Lin, S.B., Li, C.H., Lee, S.S., Kan, L.S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sciences* 72, 2381-2390.
- Lin, Y., Wei, X. (2008). The impact of large-scale forest harvesting on hydrology in the Willow watershed of Central British Columbia. *Journal of Hydrology* 359, 141-149.
- Linossier, L., Veissiere, P., Cailloux, F., Coudret, A. (1999). Effect of abscissic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Science* 124, 183-191.
- Lite, S.J., Bagstad, K.J., Stromberg, J.C. (2005). Riparian plant species richness along lateral and longitudinal gradients of water stress and flood disturbance, San Pedro River, Arizona, USA. *Journal of Arid Environment* 63, 785-813.
- Liu, Q., Yang, Z. (2010). Quantitative estimation of the impact of climate change on actual evapotranspiration in the Yellow River Basin, China. *Journal of Hydrology* 395, 226–234.
- Liu, W., Huang, Y. (2005). Compound specific D/H ratios and molecular distributions of higher plant leaf waxes as novel paleoenvironmental indicators in the Chinese Loess Plateau. *Organic Geochemistry* 36, 851-860.
- Liu, W., Yang, H. (2008). Multiple controls for the variability of hydrogen isotopic compositions in higher plant n-alkanes from modern ecosystems. *Global Change Biology* 14, 2166-2177.
- Lough, J.M., Barnes, D.J. (1989). Possible relationships between environmental variables and skeletal density in a coral colony from the central Great Barrier Reef. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 134, 221-241.

- Lu, H., Zhang, J., Liu, K.B., Wu, N., Li, Y., Zhou, K., Ye, M., Zhang, T., Zhang, H., Yang, X., Shen, L., Xu, D., Li, Q. (2009). Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Science* 106/18, 7367-7372.
- Lu, Q., Lu, C. (2004). Photosynthetic pigment composition and photosystem II photochemistry of wheat ears. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 395-402.
- Luetscher, M., Hoffmann, D.L., Frisia, S., Spötl, C. (2011). Holocene glacier history from alpine speleothems, Milchbach cave, Switzerland. *Earth and Planetary Science Letters* 302, 95-106.
- Macias, F.A., Chinchilla, N., Varela, R.M., Molinillo, J.MG. (2006). Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. *Steroids* 71, 603–608.
- Macklon, A.E.S., Weatherley, P.E. (1965). Controlled environments studies of the nature and origins of water deficits in plants. *New physiologist* 64, 414-427.
- Magny, M., 2004. Holocene climate variability as reflected by mid-European lake-level fluctuations and its probable impact on prehistoric settlements. *Quaternary International* 113, 65-79.
- Magny, M., Peyron, O., Gauthier, E., Rouèchea, Y., Bordona, A., Billaud, Y., Chapron, E., Marguet, A., Pétrequina, P., Vannièrè, B. (2009). Quantitative reconstruction of climatic variations during the Bronze and early Iron ages based on pollen and lake-level data in the NW Alps, France. *Quaternary International* 200, 102-110.
- Mahato, S.B., Nandy, A.K., Roy, G. (1992). Triterpenoids. *Phytochemistry*, 31, 2199-2249.
- Mahato, S.B., Sen, S. (1997). Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry*, 44, 1185-1236.
- Mann, D., Edwards, J., Chase, J., Beck, W., Reanier, R., Mass, M., Finney, B., Loret, J. (2008). Drought, vegetation change, and human history on Rapa Nui (Isla de Pascua, Easter Island). *Quaternary Research* 69, 16–28.
- Manzoni, S., Vico, G., Porporato, A., Katul, G. (2013). Biological constraints on water transport in the soil-plant-atmosphere system. *Advances in Water Resources* 51, 292-304.
- Margolis, E. Q., Meko, D.M., Touchan, R. (2011). A tree-ring reconstruction of streamflow in the Santa Fe River, New Mexico. *Journal of Hydrology* 397, 118–127.
- Marino, B. D., DeNiro, M. J. (1987). Isotopic analysis of archaeobotanicals to reconstruct past climates: effects of activities associated with food preparation on carbon, hydrogen and oxygen isotope ratios of plant. *Journal of Archaeological Science* 14, 537-548.

- Marinval, P., 1995. Données carpologiques françaises sur les Millets (*Panicum miliaceum* L. et *Setaria italica* L. Beauv.) de la Protohistoire au Moyen Age. In: Hörandner, E. (Ed.), Millet. Actes du Congrès d'Aizenay (1990). Peter Lang, Frankfurt, pp. 31-61.
- McInerney, F.A., Helliker, B.R., Freeman, K.H. (2011). Hydrogen isotope ratios of leaf wax n-alkanes in grasses are insensitive to transpiration. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 541-554.
- Mieth, A., Bork, H.R. (2010). Humans, climate or introduced rats – which is to blame for the woodland destruction on prehistoric Rapa Nui (Easter Island)? *Journal of Archaeological Science* 37, 417–426.
- Millot, R., Petelet-Giraud, E., Guerrot, C., Négrel, P. (2010). Multi-isotopic composition ( $\delta^7\text{Li}$ - $\delta^{11}\text{B}$ - $\delta\text{D}$ - $\delta^{18}\text{O}$ ) of rain waters in France: Origin and spatio-temporal characterization. *Applied Geochemistry* 25, 1510-1524.
- Morgan, P.W., He, C.-J., De Greef, J.A., De Proft, M.P. (1990). Does water deficit promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiology* 94, 1616-1624.
- Mors, W., do Nascimento, M., Ruppelt Pereira, B., Alvares Pereira, N. (2000). Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* 55, 627-642.
- Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.-C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H.E., Mirata, M.A., Schrader, J., Ulber, R. (2011). Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46, 1-15.
- Mugler, I., Sachse, D., Werner, M., Xu, B., Wu, G., Yao, T., Gleixner, G. (2008). Effect of lake evaporation on  $\delta\text{D}$  values of n-alkanes: A comparison of Nam Co (Tibetan Plateau) and Holzmaar (Germany). *Organic Geochemistry* 39, 711-729.
- Müller, P.J., Kirst, G., Ruhland, G., von Storch, I., Rosell-Melé, A. (1998). Calibration of the alkenone paleotemperature index U<sub>37K'</sub> based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60°N-60°S). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 1757-1772.
- Nakamura, F., Yamada, H. (2005). Effects of pasture development on the ecological functions of riparian forests in Hokkaido in northern Japan. *Ecological Engineering* 24, 539-550.
- Nasu, K., Takahashi, K., Morisaki, M., Fujimoto, Y. (2000). Stereochemical fate of C-26 and C-27 during the conversion of isofucosterol to sitosterol and of 24-methylenecholesterol to campesterol and dihydrobrassicasterol in *Oryza sativa* cell cultures. *Phytochemistry* 54, 381-385.

- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Bardoux, G., Biron, P., Ponge, J.-F., David, B., Derenne, S. (2011). Early degradation of plant alkanes in soils: A litterbag experiment using  $^{13}\text{C}$ -labelled leaves. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2222-2228.
- O'Donnell, N.H., Lindberg Møller, B., Neale, A.D., Hamill, J.D., Blomstedt, C.K., Gleadow, R.M. (2013). Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum. *Plant physiology and Biochemistry* 73, 83-92.
- Ohmoto, T., Ikuse, M. Natori, S. (1970a). Triterpenoids of the Gramineae. *Phytochemistry* 9, 2137-2148.
- Ohmoto, T., Nikaido, T., Nakadai, K., Tohyama, E. (1970b). Studies on the triterpenoids and related compounds from Gramineae plants. VII. *Yakugaku Zasshi* 90, 390-393.
- Östberg, T.L., Jonsson, A.P., Lundström, U.S. Accelerated biodegradation of n-alkanes in aqueous solution by the addition of fermented whey. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57, 190-194.
- PalHydroMil: [www.palhydromil.eu](http://www.palhydromil.eu)
- Panaud, O. (2009). The molecular bases of cereal domestication and the history of rice. *Comptes Rendus de Biologie*, 332 : 267-272
- Panfilova, T.V., Shtil', A.A., Frolov, B.A. (2006). Triterpenoid miliacin inhibits stress-induced lipid peroxidation. *Bulletin on Experimental Biology and Medicine* 141, 685-687.
- Panfilova, T.V., Shtil', A.A., Polosukhina, E.R., Baryshnikov, A. Tu., Frolov, B.A. (2003). Effect of triterpenoid miliacin on the sensitivity of lymphocytes in the thymus and spleen to dexamethasone-induced apoptosis. *Bulletin on Experimental Biology and Medicine* 136, 336-339.
- Park, R., Epstein, S. (1961). Metabolic fractionation of  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$  in plants. *Plant Physiol* 36, 133–138
- Paroutis, P., Touret, N., Grinstein, S. (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology* 19, 207-215.
- Pavoni, B., Caliceti, M., Sporni, L., Sfriso, A. (2003). Organic micropollutants (PAHs, PCBs, pesticides) in seaweeds of the lagoon of Venice. *Oceanologica Acta* 26, 585-596.
- Peng, X., Zhang, G., Mai, B., Min, Y., Wang, Z. (2002). Spatial and temporal trend of sewage pollution indicated by coprostanol in Macao Estuary, southern China. *Marine Pollution Bulletin* 45, 295–299

- Pierrehumbert, R.T. (2002). The hydrologic cycle in deep-time climate problems. *Nature* 419, 191-198.
- Pierrehumbert, R.T. (2004). High levels of atmospheric carbon dioxide necessary for the termination of global glaciation. *Nature* 429, 646–649.
- Poissonnier, B. (1994). Les anciennes variétés de millet dans le Talmondaïs (Vendée). *Industries des Céréales Juillet-Août-Septembre 1994*, 17-21.
- Polissar, P.J., Freeman, K.H. (2010). Effects of aridity and vegetation on plant-wax  $\delta D$  in modern lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 5785-5797.
- Powers, L.A., Werne, J.P., Johnson, T.C., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S. & Schouten, S. (2004). Crenarchaeotal membrane lipids in lake sediments: A new paleotemperature proxy for continental paleoclimate reconstruction? *Geology*, 32, 613-616.
- Prahl, F.G., Muehlhausen, L.A., Zahnle, D.L. (1988). Further evaluation of long-chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2303-2310.
- Quillmann, U., Marchitto, T.M., Jennings, A.E., Andrews, J.T., Friestad, B.F. (2012). Cooling and freshening at 8.2 ka on the NW Iceland Shelf recorded in paired  $\delta^{18}O$  and Mg/Ca measurements of the benthic foraminifer *Cibicides lobatulus*. *Quaternary Research* 78, 528-539.
- Raynault, D., Lorius, C. (2004). Climat et atmosphère : la mémoire des glaces. *Compte Rendu de Geoscience* 336, 647–656.
- Roberts, S.C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 3, 387 – 395.
- Roderick, M.L., Farquhar, G.D. (2002). The Cause of decreased pan evaporation over the past 50 years. *Science* 298, 1410-1411.
- Rodriguez-Gonzalez, P.M., Stella, J.C., Campeloc, F., Ferreira, M.T., Albuquerque, A. (2010). Subsidy or stress? Tree structure and growth in wetland forests along a hydrological gradient in Southern Europe. *Forest Ecology and Management* 259, 2015–2025.
- Rosenberry, D.O., Winter, T.C., Buso, D.C., Likens, G.E. (2007). Comparison of 15 evaporation methods applied to a small mountain lake in the northeastern USA. *Journal of Hydrology* 340, 149-166.
- Rosenzweig, C., Parry, M.L. (1994). Potential impact of climate change on world food supply. *Nature* 367, 133-139.

- Rullkötter, J., Peakman, T.M., ten Haven, H.L. (1994). Early diagenesis of terrigenous triterpenoids and its implications for petroleum geochemistry. *Organic Geochemistry* 21, 215-233.
- Rutherford, L. (1937). The search for the isotopes of hydrogen and helium of mass 3. *Nature* 140, 303-305.
- Sachs, J.P., Schwab, V.F. (2011). Hydrogen isotopes in dinosterol from the Chesapeake Bay estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 444–459.
- Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G. (2004). Hydrogen isotope ratios of recent lacustrine sedimentary n-alkanes record modern climate variability. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 4877-4889.
- Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G. (2006).  $\delta D$  values of individual n-alkanes from terrestrial plants along a climatic gradient – Implications for the sedimentary biomarker record. *Organic Geochemistry* 37, 469-483.
- Sachse, D., Kahmen, A., Gleixner, G. (2009). Significant seasonal variation in the hydrogen isotopic composition of leaf-wax lipids for two deciduous tree ecosystems (*Fagus sylvatica* and *Acer pseudoplatanus*). *Organic Geochemistry* 40, 732-742.
- Sachse, D., Gleixner, G., Wilkes, H., Kahmen, A. (2010). Leaf wax n-alkane  $\delta D$  values of fieldgrown barley reflect leaf water  $\delta D$  values at the time of leaf formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 6741-6750.
- Sachse, D., Billault, I., Bowen, G.J., Chikaraishi, Y., Dawson, T.E., Feakins, S.J., Freeman, K.H., Magill, C.R., McInerney, F.A., van der Meer, M.T.J., Polissar, P., Robins, R., Sachs, J.P., Schmidt, H.-L., Sessions, A.L., White, J.W.C., West, J.B., Kahmen, A. (2012). Molecular paleohydrology: Interpreting the hydrogen-isotopic composition of lipid biomarkers from photosynthetic organisms. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 40, 221-249.
- Santrucek, J., Kveton, J., Setlik, J., Bulickova, L. (2007). Spatial variation of deuterium enrichment in bulk water of Snowgum leaves. *Plant Physiology* 143, 88–97.
- Sarkar, S., Wilkes, H., Prasad, S., Brauer, A., Riedel, N., Stebich, M., Basavaiah, N., Sachse, D. (in press). Spatial heterogeneity in lipid biomarker distributions in the catchment and sediments of a crater lake in central India. *Organic Geochemistry*.
- Sauer, P.E., Eglinton, T.I., Hayes, J.M., Schiommelmann, A., Sessions, A.L. (2001). Compound-specific D/H ratios of lipid biomarkers from sediments as a proxy for environmental and climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 213-222.
- Schefuß, E., Schouten, S., Schneider, R.R. (2005). Climatic controls on central African hydrology during the past 20,000 years. *Nature* 437, 1003-1007.

- Schefuß, E., Kuhlmann, H., Mollenhauer, G., Prange, M., Paetzold, J. (2011). Forcing of wet phases in southeast Africa over the past 17,000 years. *Nature*, 480, 509–512.
- Schmidt, H.-L., Werner, R.A., Eisenreich, W. (2001). Systematic of 2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochemical Reviews* 2, 61-85.
- Sessions, A.L., Burgoyne, T.W., Schimmelmann, A., Hayes, J.M. (1999). Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Organic Geochemistry* 30, 1193-1200.
- Sessions, A.L., Hayes, J.M. (2005). Calculation of hydrogen isotopic fractionations in biogeochemical systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 593–597
- Sessions, A.L. (2006). Seasonal changes in D/H fractionation accompanying lipid biosynthesis in *Spartina alterniflora*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 2153-2162.
- Shen, J., Zeng, Y., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., Jiang, L. (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Molecular Plant* 6, 1419-1437.
- Shu, Y., Feng, X., Posmentier, E. S., Sonder, L. J., Faiia, A. M., Yakir, D. (2008). Isotopic studies of leaf water. Part 1: A physically based two-dimensional model for pine needles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5175-5188.
- Siddique, H.R., Saleem, M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Sciences* 88, 285–293.
- Smetanina, O.F., Kuznetzova, T.A., Denisenko, V.A., Pivkin, M.V., Khudyakova, Y.V., Gerasimenko, A.V., Popov, D.Y., Il'in, S.G., Elyakov, G.B., (2001). 3β-Methoxyolean-18-ene (miliacin) from the marine fungus *Chaetomium olivaceum*. *Russian Chemical Bulletin* 50, 2463-2465.
- Smit, B., 1993. Adaptation do climatic variability and change: report of the task force on climate adaptation. For the Canadian Climate Program, University of Guelph.
- Smith, F.A., Freeman, K.H. (2006). Influence of physiology and climate δD of leaf wax n-alkanes from C3 and C4 grasses. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 1172-1187.
- Smithers, J., Smit, B. (1997). Human adaptation to climate variability and change. *Global Environmental Change* 7, 129-146.
- Steele-Dunne, S., Lynch, P., McGrath, R., Semmler, T., Wang, S., Hanafin, J., Nolan, P. (2008). The impacts of climate change on hydrology in Ireland. *Journal of Hydrology* 356, 28-45.
- Sternberg, L., DeNiro, M. J., Ajie, H. (1984). Stable hydrogen isotope ratios of saponifiable lipids and cellulose nitrate from CAM, C3 and C4 plants. *Phytochemistry* 23, 2475-2477.



- Stine, A.R., Huybers, P., Fung, I.Y. (2009). Changes in the phase of the annual cycle of surface temperature. *Nature* 457, 435-441.
- Tanksley, S.D., McCouch, S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063–1066.
- Terray, L., Page, C., Deque, M., Flecher, C. (2010). L'évolution du climat en France au travers de quelques indicateurs agroclimatiques. Livre vert du projet Climator. Chapitre A1 p19-32.
- Terwilliger, V.J., Eshetu, Z., Disnar, J.-R., Jacob, J., Adderley, W.P., Huang, Y., Alexandre, M., Fogel, M.L. (2012). Environmental changes and the rise and fall of civilizations in the northern Horn of Africa: An approach combining  $\delta D$  analyses of land-plant derived fatty acids with multiple proxies in soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 111, 140-161.
- Thomson, D.J. (1995). The seasons, global temperature, and precession. *Science* 268, 59-68.
- Tierney, J.E., Russell, J.M., Huang, Y., Sinninghe Damsté, J.S., Hopmans, E.C., Cohen, A.S. (2008). Northern Hemisphere controls on tropical Southeast African climate during the past 60,000 years. *Science* 322, 252-255.
- Tinner, W., Lotter, A.F., Ammann, B., Conedera, M., Hubschmid, P., van Leeuwen, J.F.N., Wehrli, M. (2003). Climatic change and contemporaneous land-use phases north and south of the Alps 2300 BC to 800 AD. *Quaternary Science Reviews* 22, 1447–1460.
- Tipple, B.J., Pagani, M. (2013). Environmental control on eastern broadleaf forest species' leaf wax distributions and D/H ratios. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 111, 64-77.
- Tulloch, A. (1981). Epicuticular waxes of *Panicum miliaceum*, *Panicum texanum* and *Setaria italica*. 21, 2251-2255.
- Turney, C.S.M., Baillie, M., Palmer, J., Brown, D. (2006). Holocene climatic change and past Irish societal response. *Journal of Archaeological Science* 33, 34-38.
- Vardavas, I.M., Fountoulakis, A. (1996). Estimation of lake evaporation from standard meteorological measurements: application to four Australian lakes in different climatic regions. *Ecological modelling* 84, 139-150.
- Vogts, A., Schefuß, E., Badewien, T., Rullkötter, J. (2012). n-Alkane parameters from a deep sea sediment transect off southwest Africa reflect continental vegetation and climate conditions. *Organic Geochemistry* 47, 109-119.
- Volkman, J.K. (2005). Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry* 36, 139-159.



- Wang, P., Song, X., Han, D., Zhang, Y., Liu, X. (2010). A study of root water uptake of crops indicated by hydrogen and oxygen stable isotopes: A case in Shanxi Province, China. *Agricultural Water Management* 97, 475-482.
- Wang, Y., Xu, L., Rena, W., Zhaoa, D., Zhua, Y., Wu, X. (2012). Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine* 19, 364-368.
- Wu, M.M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R.Y., Moore, H.P.H., Machen, T.E. (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 33027-33035.
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261-291.
- Yang H., Huang Y. (2003). Preservation of lipid hydrogen isotope ratios in Miocene lacustrine sediments and plant fossils at Clarkia, northern Idaho, USA. *Organic Geochemistry* 34, 413-423.
- Yasuda, Y., Fujiki, T., Nasua,H., Katoc, M., Moritad, Y., Morie, Y., Kaneharaf, M., Toyamag, S., Yanoa, A., Okunoh, M., Jiejuni, H., Ishiharaj, S., Kitagawab, H., Fukusawaj, H., Narusek, T. (2004). Environmental archaeology at the Chengtoushan site, Hunan Province, China, and implications for environmental change and the rise and fall of the Yangtze River civilization. *Quaternary International* 123-125, 149-158.
- Yousaf, S., Andria, V., Reichenauer, T.G., Smalla, K., Sessitsch, A. (2010). Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials* 184, 523-532.
- Zech, M., Zech, R., Morrás, H., Moretti, L., Glaser, B., Zech, W. (2009). Late Quaternary environmental changes in Misiones, subtropical NE Argentina, deduced from multi-proxy geochemical analyses in a palaeosol-sediment sequence. *Quaternary International* 196, 121-136.
- Zech, M., Pedentchouk, N., Buggle, B., Leiber, K., Kalbitz, K., Marković, S.B., Glaser, B. (2011). Effect of leaf litter degradation and seasonality on D/H isotope ratios of n-alkane biomarkers. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 4917-4928.
- Zech, M., Rass, S., Buggle, B., Löscher, M., Zöller, L. (2012). Reconstruction of the late Quaternary paleoenvironments of the Nussloch loess paleosol sequence, Germany, using n-alkane biomarkers. *Quaternary Research* 78, 226-235.

- Zhang, D.D., Jim, C.Y., Lin G. C.-S., He, Y.-Q., Wang, J.J., Lee, H.F. (2006). Climatic change, wars and dynastic cycles in China over the last millennium. *Climatic Change* 76, 459-477.
- Zhang, C., Zhang, J., Zhao, B., Zhang, H., Huang, P. (2009). Stable isotope studies of crop carbon and water relations: A Review. *Agricultural Sciences in China* 8, 578-590.
- Zhang, Y.H., Wang, Z.M., Huang, Q., Shu, W. (2008). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ear organs is related to protein concentration in grains of winter wheat. *Journal of Cereal Science* 47, 386–391.
- Zhao, K., Li, X., Dodson, J., Atahan, P., Zhou, X., Bertuch, F. (2012). Climatic variations over the last 4000 cal yr BP in the western margin of the Tarim Basin, Xinjiang, reconstructed from pollen data. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 321, 16-23
- Zheleznova, A.D., Zheleznov, L.M., Shtil', A.A., Frolov, B.A. (2007). Morphological manifestations for the protective effect of miliacin in organs of immunogenesis after treatment with methotrexate. *Bulletin on Experimental Biology and Medicine* 144, 458-463.
- Zhou, Y., Grice, K., Stuart-Williams, H., Farquhar, G. D., Hocart, C.H., Lu, H., Liu, W. (2010). Biosynthetic origin of the saw-toothed profile in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^2\text{H}$  of n-alkanes and systematic isotopic differences between n-, iso- and anteiso-alkanes in leaf waxes of land plants. *Phytochemistry* 71, 388-403.
- Zhou, Y., Grice, K., Chikaraishi, Y., Stuart-Williams, H., Farquhar, G.D., Ohkouchi, N. (2011). Temperature effect on leaf water deuterium enrichment and isotopic fractionation during leaf lipid biosynthesis: Results from controlled growth of C3 and C4 land plants. *Phytochemistry* 72, 207-213.
- Zocatelli, R., Jacob, J., Turcq, B., Boussafir, M., Sifeddine, A., Bernardes, M.C. (2010). Biomarker evidence for recent turf cultivation in Northeast Brazil (Lagoa do Boqueirão, RN State). *Organic Geochemistry* 41, 427–430.



## **Pertinence et calibration d'un nouveau marqueur paléohydrologique : Le rapport isotopique de l'hydrogène mesuré sur la miliacine**

Résumé : Ce travail a pour objectif de développer un nouvel indicateur quantitatif des conditions hydrologiques passées fondé sur la composition isotopique en hydrogène ( $\delta D$ ) d'un biomarqueur sédimentaire spécifique du millet commun (*Panicum miliaceum*), la miliacine. L'étude de la pertinence spatio-temporelle de cet indicateur révèle que le  $\delta D$  miliacine de plants de millet dans un champ, bien que dispersé, suit une loi gaussienne. Le  $\delta D$  miliacine du sol correspond au  $\delta D$  miliacine des plantes cultivées l'année précédente. L'évolution interannuelle du  $\delta D$  miliacine est globalement parallèle à celle du  $\delta D$  des eaux météoriques, les différences pouvant être attribuées à des différences d'humidité. La comparaison des valeurs de  $\delta D$  miliacine dans des sédiments du même âge prélevés sur deux archives distinctes dans le Lac du Bourget témoigne que l'archivage de cet indicateur est intègre de manière homogène les conditions climatiques ayant régné dans le bassin versant. La culture de millet en chambre climatique démontre que, si le  $\delta D$  de l'eau de source est le principal facteur contrôlant le  $\delta D$  miliacine, ce dernier est très étroitement corrélé au  $\delta D$  de l'eau de la feuille. De légères différences de fractionnement biosynthétique net entre n-alcanes et miliacine sous deux conditions d'humidité laissent supposer que l'analyse combinée de biomarqueurs sédimentaires issus de voies synthétiques distinctes permettrait d'accéder à la fois aux variables paléoenvironnementales clé que sont le  $\delta D$  de l'eau de source et l'humidité.

Mots clés : isotopes de l'hydrogène, miliacine, paléohydrologie, broomcorn millet.

## **Relevancy and calibration of a new paleohydrological proxy based on the hydrogen isotope composition of miliacin.**

Abstract: This work aims at developing a new proxy of past hydrological conditions based on the hydrogen isotopic composition ( $\delta D$ ) of a sedimentary biomarker that is specific for broomcorn millet (*Panicum miliaceum*), miliacin. Analysing the spatio-temporal relevancy of this proxy reveals that miliacin  $\delta D$  values of plants cultivated in the field, although dispersed, follow a Gaussian law. Soil miliacin  $\delta D$  values are the same as those found for plants grown the year before. Interannual variations in plant miliacin  $\delta D$  values roughly parallel those of precipitation  $\delta D$  values, slight differences being attributed to differences in relative humidity. The comparison of miliacin  $\delta D$  values in sediments deposited in two distinct settings at the same time in Lake le Bourget attests that this proxy homogeneously integrates climatic conditions over the whole catchment. Cultivation of millet plants in climatic chambers allowed demonstrating that, although source water  $\delta D$  is the principal controlling miliacin  $\delta D$  values, this later is closely correlated to leaf water  $\delta D$ . Slight differences in net biosynthetic fractionation between n-alcanes and miliacin under two relative humidity levels imply that the combined analysis of sedimentary biomarkers produced through distinct biosynthetic pathways could help discriminating between source water  $\delta D$  and relative humidity in paleoenvironmental studies.

Keywords: hydrogen isotopes, miliacin, paleohydrology, broomcorn millet.

